

Entwicklung von chromatographischen Methoden zur Analyse von hydrophilen synthetischen Copolymeren

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs
(Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Martina Adler
aus Darmstadt

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Rehahn
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Gruber
Tag der Einreichung:	01.11.2004
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2004

Darmstadt 2004

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken

bei Herrn Prof. Dr. M. Rehahn für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Überlassung dieses interessanten Themas;

bei Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Pasch für die Betreuung, wertvolle Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit, für anregende Diskussionen und für die Durchsicht des Manuskripts;

bei allen Mitarbeitern des Deutschen Kunststoff-Instituts, die zur Durchführung dieser Arbeit in einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben, insbesondere bei allen Mitarbeitern in der Abteilung Polymeranalytik, namentlich bei C. Hock, A. Brüll, R. Brüll und D. Knecht;

bei der BASF AG und der Röhm GmbH & Co. KG für die Förderung dieser Arbeit und die Überlassung der Modellpolymere, insbesondere bei Herrn Dr. F. Rittig (BASF AG) sowie Herrn Dr. M. Augenstein, Herrn Dr. C. Meier und Herrn Dr. H.-G. Koban (Röhm GmbH & Co. KG) für die angenehme Zusammenarbeit;

beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (bmb+f, Projekt Nr. 01RC0177) und der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF, Projekt Nr. KF 0298101KUL1) für die Förderung der Arbeiten;

insbesondere bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mich immer unterstützt haben;

sowie bei meinem Ehemann Matthias.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	6
2.1 Flüssigchromatographie.....	6
2.2 Größenausschlusschromatographie.....	6
2.3 Adsorptionschromatographie.....	9
2.4 Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption.....	11
2.5 Besonderheiten der Chromatographie von hydrophilen Polymeren.....	13
2.6 Anwendung chromatographischer Methoden auf hydrophile Polymere.....	14
2.7 Grundlagen der Kopplung mit Lichtstreuendetektoren.....	18
2.8 Zweidimensionale Flüssigchromatographie.....	19
2.9 Online-Kopplung mit der Infrarot-Spektroskopie.....	23
3 Entwicklung von SEC-Methoden für hydrophile statistische Copolymere.....	25
3.1 Größenausschlusschromatographie für säuregruppenhaltige Copolymere.....	25
3.2 Größenausschlusschromatographie für ammoniumgruppenhaltige Copolymere.....	45
4 Entwicklung von gekoppelten chromatographischen Methoden für hydrophile Copolymere.....	55
4.1 Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung von verzweigten Copolymeren aus PEG und PMAS.....	55
4.1.1 Wässrige Größenausschlusschromatographie.....	57
4.1.1.1 PMAS-g-PEG-Copolymere.....	57
4.1.1.2 PEG-g-PMAS-Copolymere.....	58
4.1.2 Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption von PEG.....	61
4.1.2.1 PMAS-g-PEG-Copolymere.....	61
4.1.2.2 PEG-g-PMAS-Copolymere.....	67
4.1.3 Kopplung der Flüssigchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie.....	70

4.1.3.1 PEG-g-PMAS-Copolymere.....	71
4.1.3.2 PMAS-g-PEG-Copolymere.....	77
4.1.4 Zweidimensionale Flüssigchromatographie.....	78
4.1.4.1 PEG-g-PMAS-Copolymere.....	81
4.1.4.2 PMAS-g-PEG-Copolymere.....	86
4.2 Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung von verzweigten PEG-g-PVOH- und PEG-g-PVAc-Copolymeren.....	87
4.2.1 Wässrige Größenausschlusschromatographie.....	88
4.2.2 Chromatographie am kritischen Punkt von PEG.....	91
4.2.3 Chromatographie am kritischen Punkt von PVAc.....	93
4.2.4 Gradientenchromatographie.....	96
4.2.5 LC-FTIR-Kopplung.....	97
4.2.6 Zweidimensionale Flüssigchromatographie.....	99
5 Experimenteller Teil.....	103
5.1 Chemikalien und Lösemittel.....	103
5.2 Copolymere.....	104
5.3 Chromatographische Trennungen.....	104
5.4 FTIR-Spektroskopie.....	106
5.5 Bestimmungen mittels MALDI-TOF-MS.....	107
6 Zusammenfassung.....	108
7 Verwendete Abkürzungen und Symbole.....	112
8 Literaturverzeichnis.....	114

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Hydrophile bzw. wasserlösliche synthetische Polymersysteme haben sowohl im industriellen Umfeld als auch im Konsumgüterbereich in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Das Spektrum reicht hierbei von funktionellen Homopolymeren, die beispielsweise als Emulgatoren eingesetzt werden, bis hin zu maßgeschneiderten Copolymeren, die bei der Wirkstoffformulierung in der Pharmaindustrie oder als Bauhilfsstoffe ihre Anwendung finden. Weiterhin seien Inkrustationsinhibitoren in Waschmitteln, Filmbildner in Haarsprays, Flockungsmittel bei der Abwasseraufbereitung und Superabsorber in Babywindeln als Schlagworte genannt. Derartige Spezialpolymere weisen in den meisten Fällen sehr komplizierte chemische Strukturen auf. Für eine zielgerichtete Verbesserung und Weiterentwicklung ist es deshalb unabdingbar, leistungsfähige Analysemethoden für die Strukturaufklärung zu nutzen.

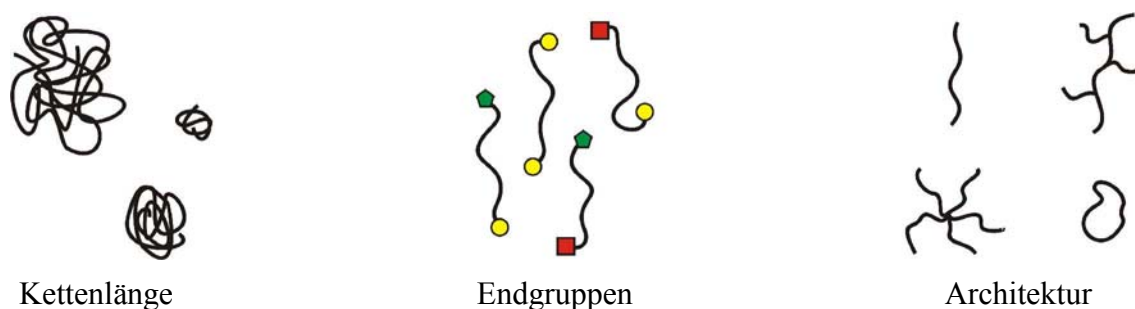


Abb. 1.1: Molekulare Heterogenität von Homopolymeren

Synthetische Polymere sind bedingt durch den Polymerisationsprozess bezüglich ihrer Molmasse immer uneinheitlich aufgebaut.^[1] Radikalische Polymerisationen führen zu breiten, anionische Polymerisationen zu relativ engen Molmassenverteilungen. Zusätzlich können selbst bei Homopolymeren noch Uneinheitlichkeiten bezüglich der Funktionalität (bei unterschiedlichen Endgruppen) und der Architektur auftreten. Wenn Polymere in Bezug auf mindestens zwei Eigenschaften heterogen aufgebaut sind, werden sie als komplex bezeichnet.

Werden unterschiedliche Monomere miteinander polymerisiert, so entstehen Copolymere, die weitere Verteilungen aufweisen können. Der Einbau der Comonomere kann statistisch, alternierend oder in Blöcken erfolgen, zusätzlich können Verzweigungen auftreten. Desweiteren können Pfropfcopolymere gebildet werden. Diese besitzen eine kammartige Struktur mit einem Rückgrat aus der ersten Komponente und Seitenketten aus dem zweiten Polymer. Ebenso ist es möglich, durch polymeranaloge Reaktionen wie der teilweisen Verseifung von Polyvinylacetat (PVAc) zu Polyvinylalkohol (PVOH) Copolymere zu erhalten.

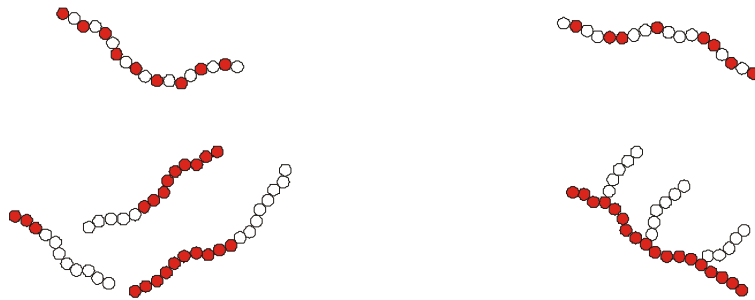


Abb. 1.2: Chemische Heterogenität von Copolymeren

Durch seine Bruttozusammensetzung und die mittlere Molmasse wird ein Copolymer nur sehr unzureichend beschrieben. Die Kenntnis von Blocklängenverteilungen sowie Seitenkettenlängen, -anzahl und -abständen ist unabdingbar, um bestimmte Polymereigenschaften besser verstehen zu können.

Für die Charakterisierung von komplexen Polymeren sind zuverlässige Analysenmethoden erforderlich. Sowohl im Rahmen von Neu- und Weiterentwicklungen als auch bei der Produktionskontrolle und Prozessoptimierung werden schnelle und leistungsstarke Techniken benötigt. Die Flüssigchromatographie weist in diesem Bereich ein sehr hohes Potential auf. Dabei hat sich insbesondere die Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography: SEC) zu einer Standardmethode für die Molmassenbestimmung entwickelt.^{[2],[3],[4]} Die SEC wird auch als Gelpermeationschromatographie (GPC) oder, bei der Analyse von Biopolymeren im wässrigen Medium, als Gelfiltrationschromatographie (GFC) bezeichnet. Wie viele Analysetechniken wurde auch die SEC ursprünglich für die Auftrennung von Biopolymeren entwickelt und wenige Jahre später auf synthetische hydrophobe Polymere übertragen.^[2] Eine große Schwierigkeit bei der SEC von sehr polaren oder sogar geladenen Polymeren besteht darin, dass die Molmassenseparation durch verschiedene unerwünschte Wechselwirkungen der Makromoleküle untereinander oder mit der stationären Phase beeinflusst wird. Diese Effekte können auf Polyelektrolyteffekte, auf Assoziat- und Mizellbildung oder Adsorption zurückgeführt werden.^[5] Um diese Faktoren zu minimieren, muss die Art und Zusammensetzung der mobilen Phase geändert werden, die ihrerseits wieder weitere Probleme verursachen kann.^{[6],[7],[4]}

Die Anforderungen an eine SEC-Trennmethode für hydrophile Polymere können durchaus sehr unterschiedlich sein. Als Beispiel sei die Analyse eines Proteingemisches genannt. Proteine weisen keine Molmassenverteilung auf, sie können jedoch mit der SEC nach ihrer Molmasse und Molekültopologie getrennt und identifiziert werden. Häufig wird die SEC auch zur Aufreinigung

der Proteine durch Abtrennung von Serumfraktionen, Koagulaten oder niedermolekularen Verunreinigungen genutzt.

Demgegenüber verfolgt die SEC im Bereich der synthetischen Polymere das Ziel, Molmassenverteilungen zu bestimmen. Wahre Molmassenverteilungen lassen sich umso schwieriger bestimmen, je komplexer die Polymerprobe aufgebaut ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von chromatographischen Methoden für ausgewählte hydrophile Copolymersysteme. Dabei sollen zuerst Einzelmethode erstellt werden, die selektiv nach der Molekülgröße oder der chemischen Zusammensetzung trennen. Anschließend soll die Kopplung in mehrdimensionalen chromatographischen Methoden erfolgen, um erstmals eine umfassende chromatographische Charakterisierung von hydrophilen synthetischen Polymeren zu ermöglichen.

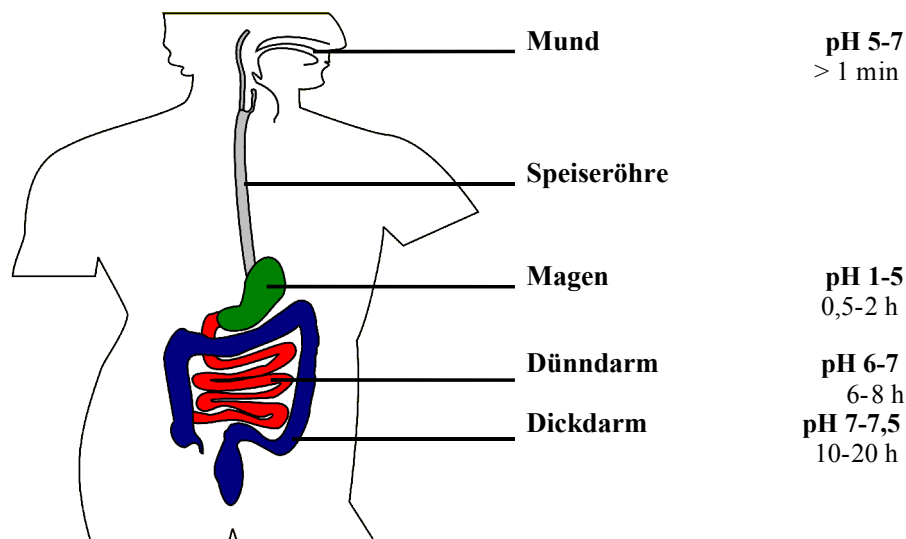


Abb. 1.3: Übersicht über die pH-Werte im Magen-Darm-Trakt; die Zeitangaben entsprechen der Zeit von der oralen Aufnahme bis zum Erreichen des entsprechenden Organs und der entsprechenden Verweildauer

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von leistungsfähigen SEC-Methoden für anionische und kationische Copolymere auf der Basis unterschiedlicher Methacrylate. Diese Copolymere sind von großem wirtschaftlichen Interesse, da sie unter dem Markennamen EUDRAGIT® als Spezialpolymere für Tablettencoatings eingesetzt werden.^[8] Sie können so maßgeschneidert werden, dass sie sich nur in einem bestimmten pH-Bereich lösen und so Wirkstoffe in definierten Regionen des Magen-Darm-Traktes freigegeben (Abb. 1.3) oder aber in sogenannten Retardformulierungen ein zeitlich verzögertes Auflösungsverhalten zeigen. Somit kann für ein Medikament, das im Dickdarm wirken soll, sowohl ein Polymer eingesetzt werden, welches sich

spontan bei einem pH-Wert über 7 auflöst, oder aber eines, welches den Wirkstoff zeitlich gesteuert nach mehr als 10 Stunden freisetzt.

Der Vorteil der pH-abhängigen Löslichkeit als Funktion der chemischen Zusammensetzung wird zu einem Nachteil, wenn eine umfassende SEC-Methode in der Lage sein soll, die Molmassenverteilung für sehr unterschiedliche Zusammensetzungen dieser Copolymere zu bestimmen. Ziel war es, je eine Methode für die im Folgenden als „anionische“ und „kationische“ EUDRAGIT®-Typen abgekürzten Copolymere zu entwickeln. Die bisher in der Literatur beschriebenen SEC-Methoden für entsprechende Acrylatcopolymere bieten entweder keine Möglichkeit zur Kalibrierung mit kommerziell erhältlichen Standards^[9] oder verlangen vor der Analyse eine Derivatisierung der enthaltenen Carboxylgruppen.^[10]

Der Hauptteil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von gekoppelten chromatographischen Methoden für die Analyse von hydrophilen synthetischen Pffropfcopolymeren.

Die Kopplung setzt voraus, dass zunächst Einzelmethoden entwickelt werden, die selektiv nach bestimmten Strukturparametern trennen. Dafür müssen geeignete stationäre und mobile Phasen gefunden werden, die eine Trennung der Probe nach unterschiedlichen Eigenschaften gewährleisten. Danach müssen diese Methoden so aufeinander abgestimmt werden, dass eine online-Kopplung durchgeführt werden kann. Wichtige Parameter dabei sind die Kompatibilität der Eluenten, die Optimierung des Zeit- bzw. Volumenbedarfs für eine Methode sowie die Auswahl geeigneter Detektoren.

Die Entwicklung der chromatographischen Verfahren wurde anhand von Modellpolymeren vorgenommen. Dafür wurden Pffropfcopolymere unterschiedlicher Struktur ausgewählt. Zum Einen wurden Kombinationen von Polyethylenglykol (PEG) und Polymethacrylsäure (PMAS) hergestellt, zum Anderen wurden Pffropfcopolymere aus PEG und Polyvinylalkohol (PVOH) verwendet. SEC-Methoden für die hydrophilen Homopolymere PEG, PVOH und PMAS sind bekannt, sie können jedoch insbesondere auch im Hinblick auf eine spätere Kopplung mit anderen Methoden nicht direkt auf komplexe Copolymere übertragen werden. Zur Untersuchung der chemischen Heterogenität der ausgewählten hydrophilen Copolymere sind bisher keine chromatographischen Verfahren bekannt.

Ziel der Arbeit ist neben der Entwicklung von chromatographischen Trennverfahren die Kopplung mit weiteren analytischen Methoden. Dadurch können zusätzliche Informationen über die zu untersuchenden Polymere gewonnen werden. Die molmassenselektive Detektion mit einem

Lichtstreuendetektor bietet die Möglichkeit, auch ohne geeignete Kalibrierstandards eine Molmassenverteilung zu ermitteln oder die Gültigkeit einer Kalibration zu überprüfen. Diese Kopplung soll im ersten Teil der Arbeit vorgestellt werden. Durch eine spezielle LC-FTIR-Kopplung kann zu jedem Punkt eines Elugramms das entsprechende FTIR-Spektrum erhalten werden, wodurch eine eindeutige Zuordnung der chemischen Zusammensetzung getroffen werden kann. Die LC-FTIR-Kopplung soll bei der Charakterisierung der im zweiten Teil beschriebenen Pfropfcopolymere zur Strukturaufklärung beitragen. Sowohl die Lichtstreu kopplung als auch die LC-FTIR-Kopplung sind in der Polymeranalytik bekannte Techniken. In der vorliegenden Arbeit soll nun gezeigt werden, wie die Übertragung auf spezielle hydrophile Polymersysteme möglich ist und wo die Grenzen in der Anwendung liegen. Die Bestimmung der Molmassenverteilung einzelner Komponenten in komplexen Polymersystemen ist nur dann möglich, wenn in einem ersten Schritt selektiv nach der chemischen Zusammensetzung getrennt wird. Im Folgenden sollen deshalb Methoden für die Adsorptionschromatographie erarbeitet werden, die in Kombination mit der SEC wahre Molmassen liefern. Kopplungen dieser Art sind bisher für hydrophile synthetische Copolymere noch nicht beschrieben.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Flüssigchromatographie

Die Flüssigchromatographie wird eingesetzt, um heterogen aufgebaute Proben in ihre Komponenten aufzutrennen. Die Separation beruht auf den unterschiedlichen Verteilungsgleichgewichten der einzelnen Probenbestandteile zwischen der stationären und der mobilen Phase. Die thermodynamische Grundlage jeder chromatographischen Trennung lässt sich in allgemeiner Form wie folgt beschreiben:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = -RT \ln K_d \quad (2.1)$$

Der Verteilungskoeffizient K_d gibt das Konzentrationsverhältnis zwischen den Solutmolekülen, die eine Wechselwirkung erfahren, zu denen in der mobilen Phase an. Nach Gl. 2.1 ist K_d direkt mit einer Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG verbunden, die sich ihrerseits aus den Änderungen der Enthalpie ΔH und der Entropie ΔS ergibt. In der klassischen Flüssigchromatographie (HPLC) von niedermolekularen Substanzen basiert die Trennung fast ausschließlich auf enthalpischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Dies können Adsorption, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Charge-Transfer-Effekte sein. In der Polymeranalytik gewinnen auch entropische Effekte bei der Chromatographie eine entscheidende Bedeutung. Vereinfachend kann man zwischen drei verschiedenen Kategorien unterscheiden: dies sind die durch enthalpische Effekte bestimmte Adsorptionschromatographie (LAC), die entropiegesteuerte Größenausschlusschromatographie (SEC) und die Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption (LC-CC), bei der sich die Beiträge von enthalpischen und entropischen Wechselwirkungen kompensieren.

2.2 Größenausschlusschromatographie

In der Polymeranalytik wird am häufigsten die SEC als Variante der Flüssigchromatographie angewendet. Das Prinzip beruht dabei auf der Trennung nach dem hydrodynamischen Volumen der Moleküle in verdünnter Lösung. Als stationäre Phase dient ein hochporöses Material. Für hydrophobe Polymere wird häufig vernetztes Styrol-Divinylbenzol (SDV) eingesetzt, während hydrophile Polymere polare, wasserbenetzbare Trennphasen erfordern. Dies können

Hydroxyethylmethacrylat-Copolymere, Polyester, Polyacrylamide, aber auch Polysaccharide oder anorganische Silicapartikel sein.

Das Gesamtvolumen einer SEC-Säule setzt sich aus dem Volumen der stationären Phase V_s , dem Zwischenkornvolumen V_Z und dem Porenvolumen V_P zusammen.

Die Trennung findet in der SEC in den Poren der stationären Phase statt. Kleine Solutmoleküle können ungehindert in einen Großteil des Porenvolumens diffundieren, während große Moleküle nur in Poren mit großem Durchmesser eindringen können. Überschreitet das hydrodynamische Volumen der Solutmoleküle die Größe der Poren, so eluieren diese zuerst von der Säule, da ihnen lediglich das Zwischenkornvolumen zugänglich ist. Kleinen Molekülen steht ein größeres Volumen zur Verfügung, dadurch erfolgt ihre Elution später.

Der Trennmechanismus wird thermodynamisch so erklärt, dass die Diffusion in die Poren der stationären Phase eine Konformations- und somit auch Entropieänderung ΔS der Polymermoleküle hervorruft. Da in der SEC ein thermodynamisch guter Eluent für die Probe gewählt wird um enthalpische Wechselwirkungen (Adsorption) zu unterdrücken, vereinfacht sich Gl. 2.1 zu:

$$\Delta H=0 \Rightarrow \Delta G=-T\Delta S=-RT\ln K_d \Rightarrow K_d=e^{\frac{\Delta S}{R}} \quad (2.2)$$

Der allgemeine Verteilungskoeffizient K_d kann als Produkt aus K_{SEC} und K_{LAC} , den Verteilungskoeffizienten für die entropisch und die enthalpisch kontrollierte Chromatographie, beschrieben werden. In der SEC können die enthalpischen Effekte vernachlässigt werden, weshalb K_d durch den Verteilungskoeffizienten K_{SEC} ersetzt werden kann. Dieser beschreibt den Anteil an zugänglichem Porenvolumen, dabei soll $\langle c \rangle_P$ die mittlere Konzentration der Solutmoleküle im Porenvolumen und $\langle c \rangle_Z$ die Konzentration im Zwischenkornvolumen sein:

$$K_{SEC}=e^{\frac{\Delta S}{R}}=\frac{\langle c \rangle_P}{\langle c \rangle_Z} \quad (2.3)$$

Das Elutionsvolumen V_E kann danach durch Gl. 2.4 beschrieben werden:

$$V_E = V_Z + K_{SEC} \cdot V_P \quad (2.4)$$

Eine Betrachtung der Grenzfälle von K_{SEC} zeigt, dass kleine Moleküle, die ungehindert in alle Poren eindringen können, keine Entropieänderung erfahren und $K_{SEC} = 1$ ist. In diesem Fall erfolgt keine Trennung, und diese Situation wird als totale Permeation bezeichnet. Für Polymerknäuel, die größer als alle Poren sind, ist auch durch Konformationsänderungen kein Eindringen in die Poren der

stationären Phase mehr möglich und K_{SEC} geht gegen 0. Auch hier kann keine Auftrennung mehr erfolgen, und die so genannte Ausschlussgrenze der SEC-Säule wird erreicht. Der Elutionsbereich wird somit nach Gl. 2.4 durch die Volumina V_Z und $V_Z + V_P$ begrenzt.

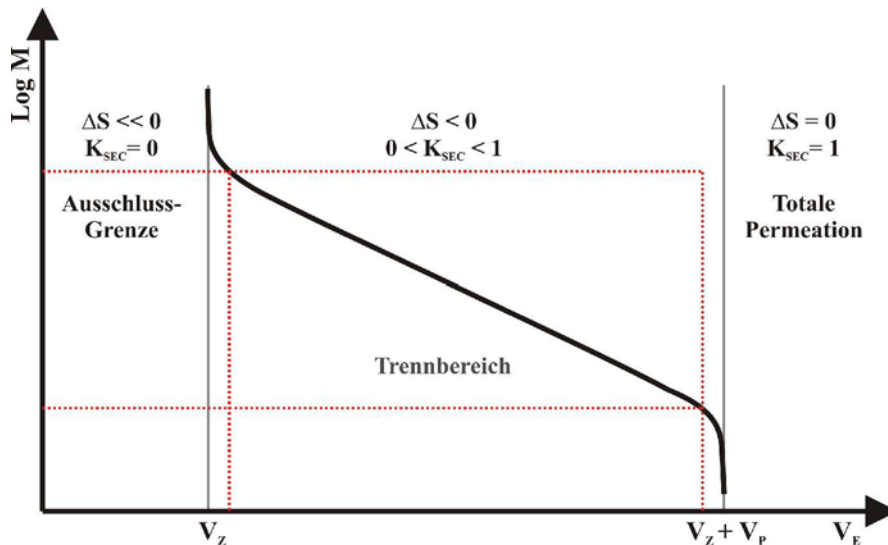


Abb. 2.1: Molmassenabhängigkeit des Elutionsvolumens

Da die Trennung in der SEC genau genommen nicht nach der Molmasse, sondern nach dem hydrodynamischen Volumen erfolgt, muss für jeden Polymertyp eine substanzspezifische Kalibrierung durchgeführt werden. Diese korreliert das experimentell bestimmte V_E mit der Molmasse. Dies ist deshalb notwendig, weil Moleküle unterschiedlicher Chemie oder Architektur bei gleichen Molmassen unterschiedliche hydrodynamische Radien aufweisen. Wenn keine Standards erhältlich sind, kann in einigen Fällen auch die so genannte universelle Kalibrierung angewendet werden, die von Benoit et al.^{[11],[12]} entwickelt wurde. Das Produkt aus der intrinsischen Viskosität $[\eta]$, die auch als Staudinger-Index bezeichnet wird, und der Molmasse verhält sich demnach proportional zum hydrodynamischen Volumen. Über die empirisch gefundene Kuhn-Mark-Houwink-Beziehung (Gl. 2.5) kann bei Kenntnis der substanzspezifischen Parameter K und a für zwei unterschiedliche Polymere eine Umrechnung ihrer Kalibrierkurven erfolgen.

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (2.5)$$

Obwohl die Gültigkeit der universellen Kalibrierung für verschiedene Architekturen^[13] sowie für Copolymere^{[14],[15]} bestätigt werden konnte, ist die experimentelle Bestimmung der notwendigen Parameter oft fehlerbehaftet. Selbst bei ansonsten gut untersuchten Polymeren werden voneinander abweichende Literaturwerte gefunden.^[16]

Wenn keine Kalibrationsstandards vorliegen, stellt die Kopplung der SEC mit molmassensensitiven Detektoren, wie dem Viskositätsdetektor und dem Lichtstreuendetektor, eine Möglichkeit zur Molmassenbestimmung dar. Der Viskositätsdetektor liefert in Verbindung mit einem Konzentrationsdetektor zu jedem Punkt des Elugramms die jeweilige intrinsische Viskosität. Mit den so erhaltenen Werten kann die Molmassenverteilung über eine universelle Kalibrierung berechnet werden.

Bei der Lichtstreuung wird die Intensität der Streustrahlung einer Polymerlösung unter verschiedenen Winkeln gemessen. Diese Intensität verhält sich proportional zur Molmasse des gelösten Polymers, die somit auf diesem Wege erhalten werden kann. Sowohl bei der Viskositäts- als auch bei der Lichtstreuung ist es wichtig, die genaue Probenkonzentration c_i in jedem Streifen i des Elugramms zu kennen. Bei Homopolymeren kann diese Information bei Kenntnis der injizierten Probenmenge über das Signal des Brechungsindexdetektors erhalten werden. Dies gilt jedoch nur, wenn das Brechungsindexinkrement dn/dc über das ganze Elutionsvolumen konstant ist. Da dn/dc von der Art des Polymers abhängt, kann es zu Problemen führen, wenn die chemische Zusammensetzung in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen variiert. Aus diesem Grund müssen Viskositäts- und insbesondere Lichtstreuemessungen von Copolymeren kritisch betrachtet werden.

2.3 Adsorptionschromatographie

Im vorangegangenen Abschnitt wurde Gl. 2.1 im Hinblick auf den Fall der idealen Größenausschlusschromatographie betrachtet. Der andere Grenzfall wäre der, dass zur freien Gibbs-Energie nur enthalpische und keine entropischen Anteile beitragen. Gl. 2.1 vereinfacht sich in diesem Fall zu:

$$\Delta S = 0 \Rightarrow \Delta G = \Delta H = -RT \ln K_d \Rightarrow K_d = K_{LAC} = \exp(-\Delta H/RT) \quad (2.6)$$

Die enthalpischen Wechselwirkungen werden dann wirksam, wenn ein thermodynamisch schlechter Eluent als mobile Phase gewählt wird und eine aktive stationäre Phase vorliegt. Die Enthalpieänderungen können durch Dispersions-, Polarisations- und Charge-Transfer-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen und Ladungsaustausch hervorgerufen werden. Da ΔH negativ ist, sind die Werte für den Verteilungskoeffizienten $K_{LAC} > 1$. In der Adsorptionschromatographie können Trennungen sowohl auf porösen als auch auf nicht porösen stationären Phasen durchgeführt werden. Die Trennung findet immer durch enthalpische

Wechselwirkungen mit der Oberfläche der stationären Phase statt und kann durch Gl. 2.7 beschrieben werden:

$$V_E = V_Z + K_{LAC}(V_P + V_S) \quad (2.7)$$

Für poröse Materialien sind zwei Grenzfälle denkbar, zum einen der, dass die Polymerknäuel größer als die Poren sind und die Wechselwirkungen nur an der Oberfläche der stationären Phase im Zwischenkornvolumen stattfinden (dann entfällt wie auch für nicht poröse Materialien in Gl. 2.7 der Term V_P). Zum anderen wäre denkbar, dass die Moleküle im Vergleich zu den vorhandenen Poren klein sind und sich ungehindert im Porenvolumen bewegen können. In diesem Fall würden auch Wechselwirkungen an der Porenoberfläche stattfinden. Im realen Fall müssten zusätzlich die dazwischen liegenden Situationen berücksichtigt werden, in denen entropische Effekte eine Rolle spielen.

Auch bei einer überwiegend enthalpisch kontrollierten Trennung von Makromolekülen ist im Elutionsverhalten eine Molmassenabhängigkeit zu beobachten. Dies liegt daran, dass die Moleküle zwar in erster Linie entsprechend ihrer Polarität unterschiedlich stark wechselwirken, jedoch werden immer nur Teile der Knäuel adsorbiert. Je größer ein Molekül ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Abschnitte seiner Kette an der Oberfläche der stationären Phase adsorbieren und desto stärker wird es retardiert. Dies wird von Glöckner^[17] als „multiple-attachment“-Mechanismus beschrieben. Die Elution erfolgt im Gegensatz zur SEC derart, dass kleine Moleküle weniger stark retardiert werden als große Polymerknäuel der gleichen Polymerart.

Die stationären Phasen werden in der Adsorptionschromatographie hauptsächlich danach ausgewählt, ob sie die erwünschten Wechselwirkungen mit den Analyten gewährleisten. Wie bereits erwähnt, ist es weniger wichtig, ob dieses Material porös ist oder nicht. Wünschenswert ist jedoch eine große Oberfläche.

Das klassische Material in der HPLC ist Kieselgel. Die Trennungen nach der Polarität mit unpolaren mobilen Phasen wird als „Normalphasen“-Chromatographie (NP-Chromatographie) bezeichnet. Da sich herausgestellt hat, dass für viele Anwendungen in der HPLC unpolare stationäre Phasen besser geeignet sind als polare Phasen, wurde eine Vielzahl unpolarer HPLC-Säulen entwickelt. Als Gegensatz zu den „Normalphasen“ werden diese als „Umkehrphasen“, englisch „reversed phase“ (RP), bezeichnet. Als mobile Phase in der so genannten RP-Chromatographie werden polare Lösemittel bzw. Lösemittelgemische eingesetzt.

2.4 Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption

Bisher wurden bei der modellhaften Betrachtung der freien Gibbs-Energie nur die Grenzfälle betrachtet, in denen entweder rein enthalpische oder rein entropische Effekte die Auftrennung der Polymerprobe bestimmen. In der Realität können zusätzliche Wechselwirkungen nie ganz ausgeschlossen werden. In der SEC können adsorptive Kräfte an der Oberfläche der stationären Phase wirken, wodurch die Elutionsvolumina zu höheren Werten verschoben werden. In den Poren sind elektrostatische Ausschlusseffekte möglich, die ebenfalls den Größenausschlussmechanismus beeinflussen. In der LAC kann sich die Anwesenheit von Poren auf das Retentionsverhalten auswirken, wenn die Solutmoleküle unter Konformations- und somit Entropieänderung in die Poren diffundieren.

Prinzipiell wird der vorliegende Trennmechanismus bei gegebener stationärer Phase hauptsächlich durch die thermodynamische Güte der mobilen Phase bestimmt. In thermodynamisch guten Eluenten ist der Beitrag ΔH zur Gibbs-Energie nur sehr gering und die Trennung erfolgt nach dem SEC-Mechanismus, wenn die stationäre Phase eine geeignete Porengrößenverteilung aufweist. Wenn die enthalpischen Wechselwirkungen überwiegen, findet die Separation im LAC-Modus statt. Nun ist es denkbar, ein Eluentengemisch zu verwenden, bei dem die enthalpischen und entropischen Beiträge zur Gibbs-Energie gleich groß werden. Aus Gl. 2.1 ergibt sich dann:

$$K_d = e^{\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}}, \quad \text{mit} \quad \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} = 0 \Rightarrow K_d = 1 \quad (2.8)$$

Da die Chemie der Moleküle einen großen Einfluss auf die enthalpischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase hat, kann diese Situation bei gegebenem chromatographischen System jeweils nur für eine bestimmte Polymerart eingestellt werden. Der Punkt, an dem der Verteilungskoeffizient genau 1 ist, wird der kritische Punkt der Adsorption genannt. Wenn sich für ein Polymer die adsorptiven und enthalpischen Effekte aufheben, dann sollte auch keine Molmassenseparation mehr erfolgen. Dies konnte experimentell bestätigt werden. Diese besondere Methode der Flüssigchromatographie wird als Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption, kurz LC-CC (liquid chromatography under critical conditions) bezeichnet. Sie wurde von Belenkii et al.^{[18],[19],[20],[21]} und Tennikov et al.^[22] zunächst für die Dünnschichtchromatographie und dann für die Flüssigchromatographie angewendet. Eine generelle Beschreibung des chromatographischen Verhaltens von Homopolymeren wurde von Skvortsov und Gorbunov^{[23],[24]} erstellt, deren Theorie auch die LC-CC als Übergang von der SEC zur LAC einschließt. Mithilfe der chromatographischen

Technik der LC-CC ist es möglich, sowohl Polymerblends^[25] als auch komplexe Polymere wie Blockcopolymere^{[26],[27],[28]} zu trennen. Letzteres ist besonders deshalb interessant, weil der Block, für den der kritische Punkt eingestellt wird, keine chromatographische Trennung erfährt. Eventuell vorhandene Homopolymere dieses Typs eluieren scheinbar ohne Wechselwirkung zusammen mit dem injizierten Lösemittel von der Säule. Die entsprechenden Blöcke sind in diesem System chromatographisch „unsichtbar“, und somit wird die unabhängige Analyse des zweiten Blockes bezüglich seiner Blocklängenverteilung oder chemischen Heterogenität möglich. Dabei gilt, dass alle Blöcke, die eine schwächere Adsorption zeigen, im SEC-Modus, und alle, die eine stärkere Adsorption zeigen, im LAC-Modus eluieren (s. Abb. 2.2). Eine weitere interessante Anwendung bietet die LC-CC im Rahmen der Endgruppenanalyse von Polymeren.^[29] Hier sei als Beispiel die Auftrennung von alkylterminierten Polyethylenoxiden^[30] genannt.

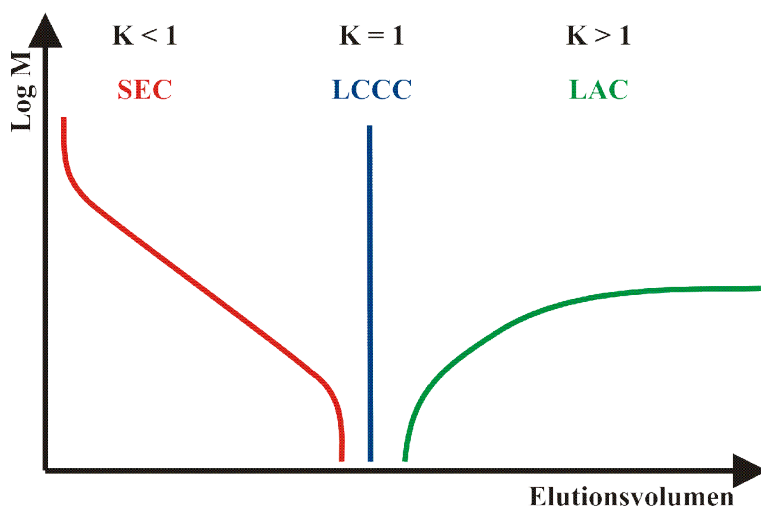


Abb. 2.2: Trennmodi der Flüssigchromatographie

Die LC-CC hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug in der Analytik komplexer Polymersysteme entwickelt.^{[4],[31]} Sie erfordert jedoch eine sehr sorgfältige Abstimmung der experimentellen Bedingungen, da bereits kleine Schwankungen in der Eluentenzusammensetzung dazu führen können, dass eine Trennung in Richtung SEC- oder LAC-Modus erfolgt. Wie aus Gl. 2.8 ersichtlich wird, ist auch eine präzise Temperierung sehr wichtig, da die Temperatur in den Enthalpieterm eingeht.

2.5 Besonderheiten der Chromatographie von hydrophilen Polymeren

Wie bereits diskutiert, können in der realen Größenausschlusschromatographie unerwünschte sekundäre Effekte auftreten, die den idealen SEC-Mechanismus stören. Polyelektrolyte, die Ladungen an ihren Polymerketten tragen, aber auch ungeladene hydrophile Polymere sind davon in besonderem Maße betroffen. Neben der Adsorption an die stationäre Phase können auch ungewollte Ausschlusseffekte eine Rolle spielen. Dabei findet eine elektrostatische Abstoßung der Polymermoleküle von der Porenoberfläche statt, sodass das apparente Porenvolumen kleiner ist als das tatsächliche Volumen. Um den enthalpischen Effekten in der realen SEC Rechnung zu tragen, muss der Verteilungskoeffizient K_{SEC} mit K_{LAC} modifiziert werden. Für die Wechselwirkungen mit der Oberfläche der stationären Phase wird der Term $V_S \cdot K_{LAC}$ ergänzt. Diese unerwünschten enthalpischen Effekte können generell bei der Größenausschlusschromatographie auftreten. Durch die Entwicklung besonders wechselwirkungsarmer stationärer Phasen und bei Verwendung thermodynamisch guter Eluenten können sie jedoch auf ein Minimum reduziert werden. Bei polaren, hydrophilen Polymeren ist die Wahrscheinlichkeit der Adsorption an die stationäre Phase größer als bei hydrophoben Polymeren. Unpolare Gele dürfen nicht verwendet werden, da bei ihnen keine Benetzung durch hydrophile mobile Phasen gewährleistet ist. Zudem können auch bei hydrophilen Copolymeren unpolare Abschnitte enthalten sein, die mit einem unpolaren Säulenmaterial hydrophobe Wechselwirkungen eingehen können. Die Bandbreite der erhältlichen Säulenmaterialien für hydrophile Polymere reicht von schwach polaren Estern über hydroxyterminierte Phasen bis hin zu sulfonierten Gelen, die auch als Ionentauscher eingesetzt werden können. Um bei derart polaren Oberflächen keinen Ionenausschluss zu begünstigen, werden der mobilen Phase Salze zugegeben.

Der Zusatz von Fremdsalzen zur mobilen Phase ist auch aus weiteren Gründen gerade bei der SEC von Polyelektrolyten unerlässlich.^{[7],[32],[33],[34],[35]} Zum einen ist hier der Polyelektrolyteffekt^[36] zu nennen. Danach führt die intramolekulare Abstoßung gleich geladener Gruppen innerhalb des Polymeren zu einer teilweisen Kettenversteifung und somit zu einer Aufweitung des Polymerknäuels im Lösemittel ohne Salzzusatz (z.B. Wasser). Dies wirkt sich in einem starken Anstieg der Viskosität bei sinkender Polyelektrolytkonzentration aus.^{[37],[1]} Durch die Zugabe von Fremdsalzen kann eine Abschirmung der Ladungen erfolgen. Dies führt zu einer Viskosität und einer Knäuelgröße, die der eines ungeladenen Polymeren entsprechen würde. Neuere Untersuchungen zeigen, dass neben den intramolekularen Effekten auch intermolekulare Wechselwirkungen am Polyelektrolyteffekt beteiligt sind.^{[38],[39]}

Ein weiterer Effekt, der bei der SEC von Polyelektrolyten auftreten kann, ist das Donnan-Gleichgewicht, das auf dem Bestreben nach Elektroneutralität beruht.^[5] Da die Poren des Säulenmaterials jeweils nur einem gewissen Anteil der geladenen Polymermoleküle zugänglich sind, kann sich ein osmotischer Druck zwischen den Poren und dem Zwischenkornvolumen ausbilden. Dies führt zu einer Retention der größeren Moleküle und wird als Ioneneinschluss bezeichnet.

Alle genannten Ladungseffekte können durch die Zugabe von Salzen minimiert werden, da jeweils eine Ladungsabschirmung eintritt, und die Elektroneutralität der Lösung in allen Bereichen der stationären Phase erreicht werden kann. Letzteres führt aber auch dazu, dass ein Teil des Salzes ebenfalls retardiert wird und einen unter Umständen sehr intensiven Salzpeak nahe dem Punkt der totalen Permeation hervorruft.

Weitere Effekte, die bei der SEC geladener Polymerer auftreten und durch Salze minimiert werden können, sind Assoziat- und Mizellbildungen.

2.6 Anwendung chromatographischer Methoden auf hydrophile Polymere

Es gibt nur wenige chromatographische Verfahren, die sich für die Bestimmung der chemischen Heterogenität von hydrophilen synthetischen Polymeren eignen. Das in diesem Bereich am besten untersuchte System ist Polyethylenglykol. PEG ist ein wasserlösliches, aber nicht ionisches Polymer, welches in großem Maßstab sowohl als Homopolymer als auch in Copolymeren eingesetzt wird. Genannt seien hier Alkyl- oder Aryloxyterminierte Polyethylenoxide, die als Emulgatoren und Bindemittel Verwendung finden. Fettalkoholethoxylate (FAE) werden in großem Maßstab als nicht ionische Tenside eingesetzt und können je nach Molmasse des PEG-Segments sowohl als endgruppenfunktionalisierte PEG-Oligomere als auch als Blockcopolymere angesehen werden. Blockcopolymere aus Ethylenoxid und Propylenoxid (EO-PO) dienen als Polyole für die Polyurethanherstellung. Durch die Wahl geeigneter Starter für die Polymerisation von Ethylenoxid kann die Polyolfunktionalität gesteuert werden (z.B. Glycerol: $f=3$, Pentaerythrit: $f=5$).

Rissler^[40] fasst in einem Übersichtsartikel über die HPLC von Polyethern und ihren Derivaten den Stand der Technik zur Untersuchung von Polyethylenglykolen zusammen. Systematische Untersuchungen zum Retentionsmechanismus von PEG und FAE in der NP- und RP-Chromatographie wurden von Trathnigg et al.^{[41],[42]} und Cho et al.^{[43],[44]} durchgeführt. Cho

konzentrierte sich dabei auf das temperaturabhängige Retentionsverhalten von PEG auf RP-Phasen. FAE's wurden sowohl aufgrund ihres wirtschaftlichen Interesses als auch durch ihre interessante Struktur mit verschiedenen chromatographischen Methoden untersucht. Neben der bereits genannten RP- und NP-Chromatographie sei hier die Gradientenchromatographie^[45] sowie die LC-CC^[46] erwähnt. Pasch^[47] gelang durch die Kopplung der LC-CC mit MALDI-TOF die Deformulierung von FAE, indem im Anschluss an die Auftrennung nach der Funktionalität eine exakte Molmassenbestimmung der einzelnen Fraktionen durchgeführt werden konnte. Entsprechende Methoden wurden auch auf alkyloxy- und aryloxyterminierte Polyethylenglykole angewendet.^{[48],[30]} Die exakte Strukturaufklärung eines aryloxyterminierten, technischen Polyethylenoxids gelang Pasch und Hiller^[49] durch die online-Kopplung der HPLC mit der NMR. Nur durch ein hochauflösendes Spektrometer und eine sorgfältig ausgearbeitete Methode zur Unterdrückung der Lösemittelsignale war es möglich, eine direkte online-Kopplung (ohne stopped-flow-Technik) durchzuführen. So konnten Nebenprodukte geringer Konzentration detektiert und identifiziert werden.

Mit dem Ziel, EO-PO-Blockcopolymere umfassend charakterisieren zu können, wurden sowohl die bekannten eindimensionalen Techniken angewendet^{[50],[51]}, als auch Kopplungen zweier chromatographischer Methoden durchgeführt. Durch eine präparative Fraktionierung mittels LC-CC wurde eine Trennung nach der PO-Kettenlänge erreicht. Anschließend erfolgte die Trennung der einzelnen Fraktionen nach der EO-Kettenlänge mit der Superkritischen Flüssigchromatographie und der SEC.^{[52],[53]} Auch Online-Kopplungen der LC-CC mit der SEC wurden für EO-PO-Copolymere^{[54],[4]} sowie für FAEs^{[55],[56]} realisiert. Dabei wurde jedoch in allen Fällen eine konventionelle SEC mit Tetrahydrofuran als Eluent eingesetzt. Ein weiteres Beispiel für die zweidimensionale Chromatographie von FAE's ist die Kopplung der LC-CC mit der chromatographischen Methode der „Ausschluss-Adsorptionschromatographie“ (LEAC), die ähnlich wie die SEC nach sinkender Molmasse trennt.^{[57],[58]} Bisher sind jedoch keine Verfahren zur zweidimensionalen Chromatographie mit wässriger SEC bekannt.

Neben der Entwicklung von HPLC-Techniken für die Analyse von hydrophilen Polymersystemen ist die Entwicklung zuverlässiger SEC-Methoden für Polymere von hoher Polarität eine große Herausforderung. Während für niedermolekulare Polyethylenglykole auch Standard-Methoden mit SDV-Säulen und THF als Eluent angewendet werden können und eine wässrige GPC je nach Bedingungen auch ohne Salzzusatz zum Eluenten durchgeführt werden kann, ist dies bei Polyvinylalkohol (PVOH) nicht mehr möglich. PVOH ist wie PEG ein nichtionisches hydrophiles

Polymer. Es ist jedoch nur in stark polaren Lösemitteln löslich und bildet in wässriger Lösung intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus, wodurch der Größenausschlussmechanismus gestört wird. Dieser unerwünschte Effekt kann durch Zusatz von Salzen zum Wasser unterdrückt werden.^[59]

Die technische Herstellung von PVOH erfolgt durch Hydrolyse von Polyvinylacetat (PVAc). Wegen häufig unvollständiger Verseifung liegt oft nicht das Homopolymer, sondern ein Gemisch aus unterschiedlich stark verseiftem PVAc vor. Dawkins et al. haben Untersuchungen an Polyvinylalkoholen unterschiedlichen Verseifungsgrades durchgeführt. In diesem Rahmen entwickelten sie eine optimierte SEC-Methode für PVOH mit unterschiedlichem Verseifungsgrad.^[60] Unterhalb eines Verseifungsgrades von 80 % muss demnach dem Eluenten Natriumlaurylsulfat in geringen Konzentrationen zugesetzt werden, um einen reinen Größenausschlussmechanismus zu gewährleisten. Bei einem Verseifungsgrad oberhalb von 80 % genügt eine wässrige Elektrolytlösung als Eluent. Die chemische Heterogenität von Polyvinylacetat bestimmten Dawkins et al.^[61] durch Gradienten-HPLC. Gradiententechniken wurden auch erfolgreich für die Ermittlung des Rest-PVOH-Gehalts in Polyvinylbutyral eingesetzt, welches durch Umsetzung von PVOH mit Butyraldehyd gewonnen wird.^[62] Die Arbeitsgruppe um El-Aasser befasste sich mit chromatographischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Sequenzverteilung der VAc-Einheiten in technischem PVOH^[63] und der Pfropfreaktion von VAc auf PVOH^[64]. Dabei griffen sie die von Dawkins vorgeschlagenen Methoden als Ergänzung zu den NMR-Messungen und zur Analyse von Extrakten aus einer Emulsionspolymerisation auf.

Geladenen Polymeren muss in der SEC grundsätzlich ein Elektrolyt zum Eluenten zugesetzt werden um Wechselwirkungen zu unterdrücken, die nicht auf dem Größenausschlussmechanismus beruhen. Callec et al.^[65] optimierten die SEC in alkalischen (0,42 M NaOH) Eluenten und überprüften und bestätigten die Gültigkeit der universellen Kalibration für verschiedene wässrige Polymerstandards. Muller und Yonnet^[66] verglichen SEC-Messungen von teilhydrolysierten Polyacrylamiden bei unterschiedlichen Ionenstärken mit den durch Lichtstreuung bestimmten Trägheitsradien der Moleküle. Sie postulierten, dass besonders bei hochmolekularen Polyelektrolyten hohe Salzkonzentrationen (1 M NaCl) verwendet werden können, da dann der Trägheitsradius besonders gering wird. Kato et al.^[67] wiesen nach, dass bei der SEC von Polyacrylsäure in Folge geringer Elektrolytkonzentrationen des Eluenten zum einen elektrostatische Ausschlusseffekte auftreten und – in stärkerem Maße – ein Donnan-Effekt, der zur Peakverbreiterung führt. Mit steigender Salzkonzentration im Eluenten können diese Effekte reduziert werden, was zu schmalere Peaks

und geringeren Elutionsvolumina führt. Die Ergebnisse aus der SEC mit konventioneller Kalibrierung wurden mit denen von online- und offline-Lichtstreuemessungen verglichen.

Der Einfluss des Elektrolytgehaltes im Eluenten auf störende Sekundäreffekte (Ionenausschluss, Ioneneinschluss, Donnan-Effekt, Adsorption) bei der SEC von Zellulosederivaten wurde von Barth^{[68],[69]} untersucht und publiziert. Mori^{[32],[70]} analysierte die Sekundäreffekte, die bei der SEC von Polystyrolsulfonaten mit unterschiedlichen Eluenten und stationären Phasen auftreten. Er kommt dabei zu dem Schluss, dass diese Effekte durch geeignete Bedingungen reduziert, aber nie eliminiert werden können. In einigen Fällen werden abhängig von der Polarität der Polymere auch modifizierte organische Eluenten (THF/DMF mit Lithiumbromid und Phosphat) eingesetzt.^{[62],[71]}

Die meisten dieser Untersuchungen beziehen sich jedoch auf Homopolymere. Die Größenausschlusschromatographie von Copolymeren gestaltet sich deshalb problematisch, weil in einem Makromolekül Gruppen stark unterschiedlicher Polarität auftreten können (z.B. geladene und unpolare Gruppen), für die jeweils gewährleistet sein muss, dass sie im Größenausschlussmodus eluieren. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, werden häufig Derivatisierungen durchgeführt, die die Copolymere in nichtgeladene Moleküle überführen. Als Beispiel sei hier die Hydrolyse vom Blockcopolymeren Poly(acrylsäure-b-butylacrylat) zur Polyacrylsäure^[72] oder die Methylierung des statistischen Copolymeren Poly(methylmethacrylat-co-methacrylsäure) (P(MMA-co-MAS)) zu PMMA^[10] genannt. Für die entstehenden Produkte existieren sowohl ausgearbeitete SEC-Methoden als auch geeignete Kalibrierstandards. Diese Derivatisierungen sind jedoch zeitaufwendig und zudem nicht in jedem Analysenlabor durchführbar. Bei säurehaltigen Terpolymeren mit hydrophilen Oligoethylenglykol-Seitenketten konnten SEC-Messungen ohne vorhergehende Derivatisierung durchgeführt werden.^[73] Die Molmassenverteilung eines methylmethacrylathaltigen Copolymeren mit kationischen Gruppen wurde durch wässrige SEC mit online-Lichtstreuung bestimmt.^[9]

Neben den aufgeführten SEC-Methoden sind kaum HPLC-Methoden zur Charakterisierung von geladenen Polymeren bekannt. Schunk^[10] entwickelte eine Methode, um PMMA-PMAS-Copolymere nach ihrer chemischen Zusammensetzung zu trennen. Durch einen linearen Gradienten von niedrigem zu hohem Gehalt von Methanol/Essigsäure in Toluol auf einer Silica-Säule werden die Copolymere nach steigendem PMAS-Anteil eluiert. Olesik et al.^{[74],[75]} bestimmten die kritischen Bedingungen für Polystyrolsulfonat und Polyacrylsäure. Dabei wurden SEC-Säulen und elektrolythaltige Eluentengemische eingesetzt. Diese hatten eine Zusammensetzung von Wasser : Acetonitril 46:54 mit 23 mM Acetat für Polystyrolsulfonat und Wasser : Acetonitril 53:47 mit 17 mM Phosphat für Polyacrylsäure.

2.7 Grundlagen der Kopplung mit Lichtstreuendetektoren

Da die SEC lediglich eine Relativmethode darstellt, bietet die Kopplung mit einem Durchflusslichtstreuendetektor die Möglichkeit, auch ohne geeignete Kalibrationsstandards die Molmassenverteilung von Polymeren zu bestimmen. Die Streuung von vertikal polarisiertem Licht an den Molekülen einer verdünnten Polymerlösung wird durch Fluktuationen des Brechungsindex hervorgerufen. Dabei gilt für das Exzess-Rayleigh-Verhältnis $R(\theta)$ – die Streustrahlung, die unter dem Streuwinkel θ zusätzlich zu der des Lösemittels erzeugt wird – bei kleinen, isotrop streuenden Molekülen in unendlicher Verdünnung folgende Beziehung:

$$R(\theta) = \frac{I(\theta) \cdot r^2}{I_0} = K \cdot c \cdot M \quad \text{mit} \quad K = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2}{\lambda_0^4 \cdot N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (2.9)$$

Dabei sind I_0 und $I(\theta)$ die Intensitäten des einfallenden Lichtstrahls und die des gestreuten Lichtes unter dem Winkel θ ; r ist der Abstand zwischen dem Streuzentrum und dem Detektor, und c und M sind die Massenkonzentration und das Molekulargewicht der gelösten Substanz. K stellt eine optische Konstante dar, die sich aus der Wellenlänge λ_0 des eingestrahnten Lichtes, der Avogadro-Konstante N_A und dem Brechungsindex n_0 des Lösungsmittels bei λ_0 zusammensetzt.

Bei gelösten Molekülen, deren Dimensionen im Vergleich zur eingestrahnten Wellenlänge groß sind, tritt eine Winkelabhängigkeit der Streustrahlung auf, die im Formfaktor $P(\theta)$ berücksichtigt wird, welcher Aussagen über die Molekülgeometrie möglich macht. Für höhere Konzentrationen kann die Konzentrationsabhängigkeit durch einen Virialansatz einbezogen werden. Durch die Entwicklung einer Potenzreihe erhält man für $A_2 \cdot c \cdot M \cdot P(\theta) \ll 1$ die für die Auswertung von Lichtstreuendaten relevante Gleichung

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{P^{-1}(\theta)}{M} + 2 A_2 \cdot c \quad (2.10)$$

Gl. 2.10 gilt für monodisperse Systeme, bei polydispersen Proben wird M durch die gewichtsmittlere Molmasse M_w ersetzt.

Bei einer statischen Lichtstreuungsmessung können nur mittlere Werte für die Molmasse M_w und den Trägheitsradius erhalten werden. Die direkte Kopplung mit der SEC bietet dagegen die Möglichkeit, die Polydispersität der Probe zu untersuchen. Eine detaillierte Zusammenstellung der Vorteile und Anwendungen von Lichtstreukopplungen ist von Wyatt^[76] verfasst worden.

Für die Kopplung mit der SEC sind verschiedene Durchflusslichtstreuendetektoren auf dem Markt, die die Detektion unter einem oder mehreren Streuwinkeln ermöglichen. Die Vielwinkellichtstreugeräte (multi angle laser light scattering: MALLS) haben den Vorteil, dass neben der Molmassenbestimmung auch Aussagen über die Geometrie der untersuchten Moleküle getroffen werden können. Die Messung erfolgt derart, dass das aus der SEC kommende Eluat eine Glaszelle durchfließt, die von mehreren Photodioden umgeben ist. Die Zelle wird von einem Laser durchstrahlt und das Streulicht bei festgelegten Winkeln detektiert. Aus den so erhaltenen Werten von $R_i(\theta)$ für die chromatographischen Streifen i und der entsprechenden Konzentration c_i , die durch den hinter dem MALLS-Detektor gekoppelten Brechungsindexdetektor bestimmt wird, können die Molmasse und der Trägheitsradius für jeden chromatographischen Streifen berechnet werden. Da in die Konstante K das Brechungsindexinkrement dn/dc eingeht, muss dieses für die zu untersuchende Probe in dem verwendeten Lösemittel bestimmt werden. Dazu wird der Brechungsindex für verschiedene Konzentrationen bestimmt. Dies erweist sich für geladene Polymere als schwierig, da sie meist in Salzlösungen vermessen werden, und die unmittelbare Solvathülle nicht die gleiche Zusammensetzung aufweist wie der umgebende Eluent. Diese Unterschiede können einen Einfluss auf den gemessenen Brechungsindex und somit auch auf das Brechungsindexinkrement haben. Um das zu verhindern, sind aufwendige Dialysen notwendig, durch die ein Angleichen der Zusammensetzung von Solvathülle und der Umgebung erreicht werden kann. Nach Brüssau et al.^[77] ist es jedoch möglich, auf diese Dialyse zu verzichten, wenn die dn/dc -Bestimmung im Anschluss an eine SEC-Messung erfolgt. Dies ist auf das Donnan-Gleichgewicht zurückzuführen, das sich während der chromatographischen Trennung einstellt. Das Brechungsindexinkrement kann dann aus den Lichtstreudaten errechnet werden, wenn die injizierte Probenmenge und die Gerätekonstante des Brechungsindexdetektors bekannt sind.

2.8 Zweidimensionale Flüssigchromatographie

Die verschiedenen Trennmodi, die in der Flüssigchromatographie zur Verfügung stehen, können ausgenutzt werden, um bei der Analyse von komplexen Polymeren einerseits einen Aufschluss über die Molmassenverteilung und andererseits Informationen über die chemische Heterogenität zu erhalten. Es ist aus den Einzelinformationen heraus jedoch nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, wie beispielsweise die Molmassenverteilung mit den chemisch unterschiedlichen Komponenten einer Probe korreliert. Aus diesem Grund wurden verschiedene Ansätze zur

Kopplung chromatographischer Methoden miteinander oder mit selektiven Detektoren entwickelt. [16],[78],[79] Für die Verknüpfung der Trennung nach einer Eigenschaft (z.B. Molmassenverteilung) mit der nach einer anderen Eigenschaft (z.B. chemische Heterogenität), wurde von Balke et al. [80] der Begriff der orthogonalen Chromatographie eingeführt. Balke und Mitarbeiter vereinfachten die Kopplung derart, dass sie mit dem Eluat aus einer SEC-Anlage eine Probenschleife befüllten, den Fluss stoppten und den Inhalt der Schleife in eine zweite SEC-Anlage injizierten. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Probe vom ersten Säulensatz vollständig eluiert war. Für die zweite Anlage wurde ein thermodynamisch schlechter Eluent gewählt, sodass hier eine Trennung nach chemischer Heterogenität erfolgte.

Gegenüber dem Begriff der orthogonalen Chromatographie hat sich inzwischen der zweidimensionalen Chromatographie (2D-Chromatographie) durchgesetzt. Unabhängig vom Grad der Automatisierung kann gesagt werden, dass durch die Kopplung von zwei Dimensionen der Chromatographie mehr Aussagen über die untersuchten Polymere getroffen werden können, als dies durch Summe der Informationen der einzelnen Dimensionen möglich ist. Abb. 2.3 soll dies verdeutlichen.

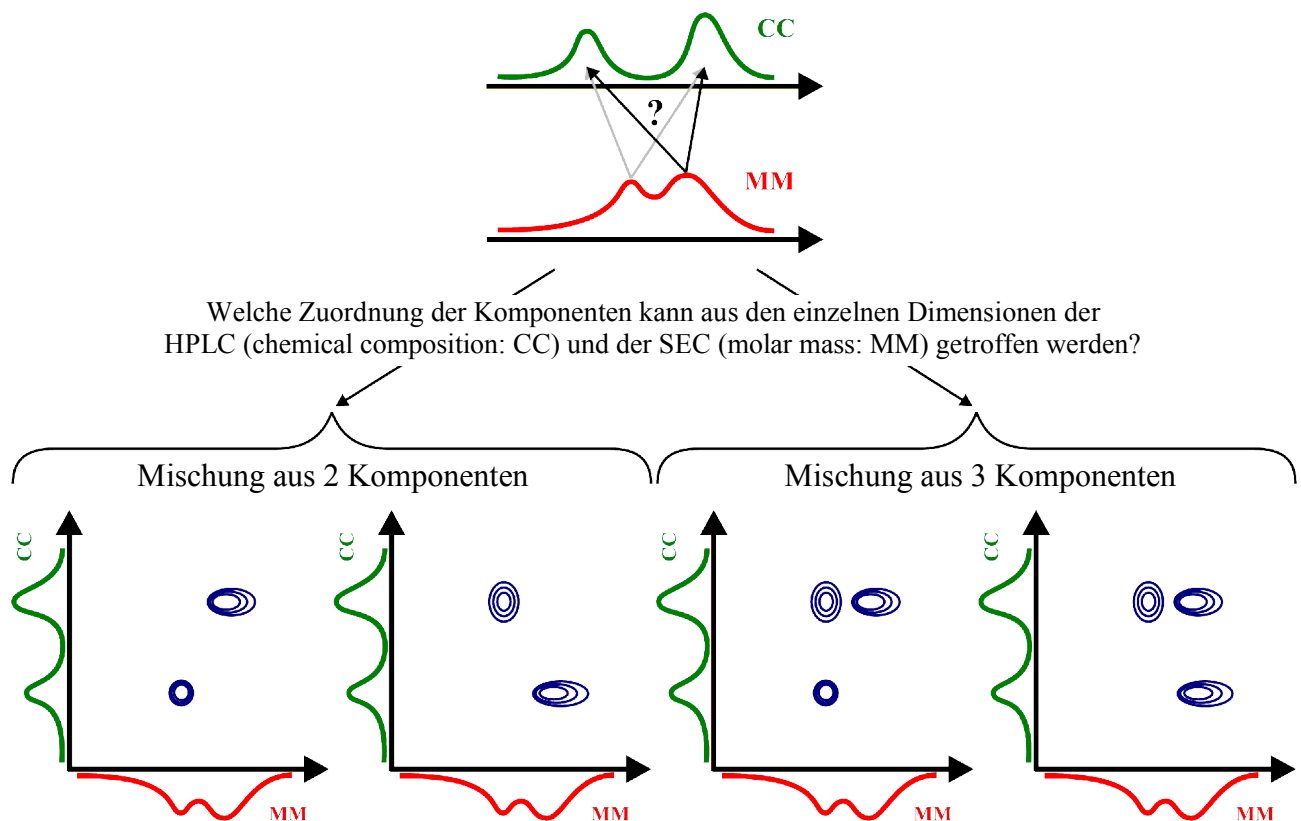


Abb. 2.3: Konturplots verschiedener Polymerblends mit gleichem chromatographischem Verhalten

Aus einer bimodalen Molmassenverteilung kann kein Rückschluss auf die Zuordnung zur chemischen Heterogenität der gleichen Probe getroffen werden. Um mögliche Korrelationen anschaulich darstellen zu können, wird in einem Diagramm die aus der SEC erhaltene Molmassenverteilung auf der Abszisse und das Elugramm einer Auftrennung nach chemischer Heterogenität (aus einer HPLC-Methode) auf der Ordinate aufgetragen. Die Projektion der Peaks in das Koordinatensystem ergibt so genannte Konturplots, die – ähnlich einer Landkarte – die Peakintensitäten in Form von Höhenlinien wiedergeben.

Allein in dem in Abb. 2.3 gezeigten Beispiel sind für gegebene Elugramme der beiden Dimensionen HPLC und SEC zwei verschiedene Zuordnungen möglich, falls die Probe lediglich aus zwei Komponenten aufgebaut ist. Es wären jedoch auch kompliziertere Zusammensetzungen aus drei oder gar 4 Komponenten in unterschiedlichen Mengenanteilen denkbar. Daraus wird deutlich, dass die Anwendung beider Methoden für sich keinen hinreichenden Aufschluss über die Probenzusammensetzung ergeben hätte. Diese Beobachtung rechtfertigt den hohen Aufwand, der für die Durchführung einer 2D-Chromatographie nötig ist.

Nachdem zweidimensionale Trennungen in der Copolymeranalytik in stärkerem Maße in Form von offline 2D-Messungen (Fraktionieren und Eindampfen der Fraktionen aus der ersten Dimension mit anschließender Untersuchung der Fraktionen in der zweiten Dimension) oder in der beschriebenen stopped-Flow-Technik eingesetzt wurden, entwickelten Kilz et al.^{[81],[82],[83],[84]} in Zusammenarbeit mit der BASF AG die erste kontinuierliche online-Kopplung.

Diese Technik wird von Pasch et al.^{[85],[86],[87]} ausführlich beschrieben. In der online-2D-Chromatographie werden zwei chromatographische Methoden über ein 8-Port-Schaltventil miteinander verbunden, mit dem zwei Probenschleifen abwechselnd geschaltet werden können. Mit dem Eluat der ersten Dimension (z.B. eine HPLC-Trennung) wird bei einer geringen Flussrate die erste Probenschleife befüllt, deren Inhalt dann automatisiert in die zweite Dimension (z.B. eine SEC-Trennung) injiziert wird. Während diese Fraktion analysiert wird, kann die zweite Probenschleife befüllt und – nachdem die zweite Dimension wieder für einen Injekt bereit ist – injiziert werden. Durch Wiederholen dieses Vorgangs wird das Elugramm der ersten Dimension in Fraktionen von der Größe der Probenschleife zerlegt und ohne zeitliche Verzögerung in der zweiten Dimension analysiert. Dabei wird aus verschiedenen Gründen in der ersten Dimension eine HPLC-Methode (LC-CC oder Gradientenchromatographie) und in der zweiten Dimension eine SEC-Methode eingesetzt. In der SEC erfolgt die Trennung nach hydrodynamischem Volumen, d.h. bei der Chromatographie von Polymermischungen können in einem Elutionsstreifen Makromoleküle

gleichen Volumens aber unterschiedlicher Molmasse enthalten sein. Wenn die SEC in der ersten und die Trennung nach chemischer Heterogenität erst in der zweiten Dimension erfolgen würde, wäre keine Bestimmung der Molmassenverteilung möglich, da im gleichen Elutionsvolumen der SEC Probenbestandteile mit gleichem hydrodynamischen Radius aber unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung und unterschiedlicher Molmassen eluieren können. Aus diesem Grund muss zunächst eine Auftrennung nach unterschiedlicher Chemie und dann nach der Molmasse erfolgen. Dann ist auch die Möglichkeit gegeben, unterschiedliche substanzspezifische Kalibrationen für bestimmte Elutionsbereiche einzusetzen. Weitere Gründe für die Wahl der Reihenfolge der ersten und zweiten Dimension sind die, dass auf HPLC-Säulen ohne Überladungseffekte höhere Probenkonzentrationen aufgegeben werden können als auf SEC-Säulen und die Tatsache, dass zwei Techniken mit unterschiedlichen Eluenten gekoppelt werden. Da HPLC-Methoden auf einen Eluentenwechsel wesentlich empfindlicher reagieren als SEC-Methoden, begründet dies den Einsatz der HPLC in der ersten Dimension. Die Gesamtanalysenzeit wird durch optimierte (möglichst hohe) Flussraten der SEC sowie durch das Elutionsvolumen der HPLC und die Größe der Probenschleifen bestimmt. Das Schema einer 2D-Anlage ist in Abb. 2.4 wiedergegeben.

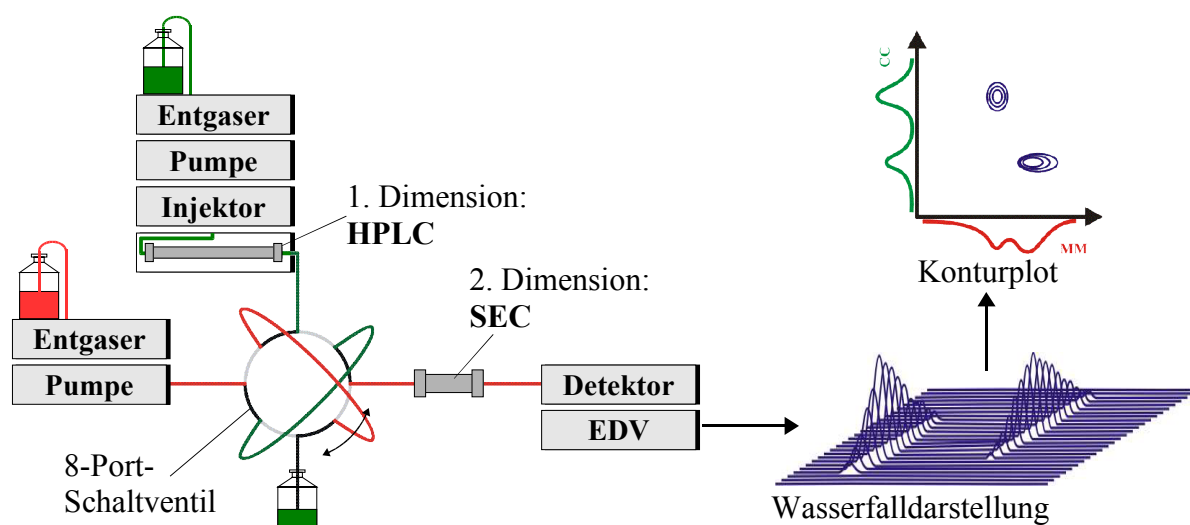


Abb. 2.4: Schema einer 2D-Anlage

Der Konturplot wird dabei direkt aus den Elugrammen der einzelnen Fraktionen erstellt und bietet somit eine Möglichkeit zur eindeutigen Zuordnung der Chemie und der Molmassenverteilung der einzelnen Probenbestandteile. Durch eine Projektion der Höhenlinien auf die Achsen ist eine Rekonstruktion der Elugramme für die Gesamtprobe möglich.

Die 2D-Chromatographie ist wegen ihres hohen apparativen Aufwandes keine Methode, die in der Routineanalytik, sondern hauptsächlich in der Grundlagenforschung eingesetzt wird. Sie wird jedoch inzwischen für spezielle Fragestellungen bei der Aufklärung von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen bei komplexen Polymeren auch in einigen Forschungslaboratorien der Industrie angewendet. Für hydrophile synthetische Polymere existieren bisher keine Applikationen der 2D-Chromatographie, da es bislang keine entsprechenden HPLC- und SEC-Methoden gab.

2.9 Online-Kopplung mit der Infrarot-Spektroskopie

Die chemische Struktur von Polymeren kann durch spektroskopische Methoden wie die Infrarot-Spektroskopie (IR) und die magnetische Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) bestimmt werden. Dabei ist aber immer nur eine Aussage über die Bruttozusammensetzung möglich. Um detaillierte Informationen über die Verteilung unterschiedlicher Bestandteile in einer Polymerprobe zu erhalten, sind Kopplungen der Flüssigchromatographie mit spektroskopischen Methoden erforderlich. Ein einfaches Beispiel stellt die Dualdetektion mit einem universellen Brechungsindexdetektor und einem UV-Detektor dar. Da der UV-Detektor spezifisch auf bestimmte Strukturelemente anspricht, kann deren Anteil an jedem Punkt des Elugramms bestimmt werden. Mithilfe der UV-Detektion ist jedoch in den meisten Fällen keine Identifizierung von unbekannten Polymeren möglich. Dafür müssen spezifischere Methoden eingesetzt werden. Für die FTIR-Spektroskopie existieren ebenfalls Durchflussdetektoren (in Form einer Durchflusszelle, die in einem Transmissions-FTIR-Spektrometer platziert wird), ihre Anwendung bleibt jedoch auf IR-transparente Lösemittel wie Chloroform beschränkt. Die meisten in der Flüssigchromatographie eingesetzten Eluenten sind für die IR-Spektroskopie in Lösung ungeeignet. Um diese Limitierung zu umgehen, wurde eine Methode entwickelt, die das Lösemittel vor der IR-Detektion entfernt.^{[88],[89],[90],[91]}

Im Interface, mit dem die online-LC-FTIR-Kopplung durchgeführt wird, wird das Eluat nach der Chromatographie durch eine beheizte Düse geleitet und im Luftstrom auf eine rotierende Germaniumscheibe gesprüht. Das Lösemittel wird dabei verdampft und die Polymerprobe als Streifen oder Fleck auf der Scheibe abgelagert. Nach erfolgtem Auftragen wird die Germaniumscheibe manuell in ein FTIR-Spektrometer überführt und winkelabhängig abgerastert. Dabei tritt der IR-Strahl zunächst durch die Probe, dringt durch das IR-transparente Germanium und wird an einer Aluminiumschicht an der Unterseite der Germaniumscheibe reflektiert. Dadurch wird die Probe erneut durchstrahlt.

Zu jedem Punkt des Elugramms kann ein vollständiges IR-Spektrum erhalten werden. Auf diese Weise wird es möglich, unbekannte Proben zu identifizieren und chromatographisch abgetrennte Bestandteile, die nur in geringen Konzentrationen enthalten sind, zu bestimmen. Um Copolymerzusammensetzungen zu ermitteln, werden für die einzelnen Bestandteile spezifische IR-Banden ausgewertet. Aus der Summe der Intensitäten aller Spektren wird eine sogenannte Gram-Schmidt-Darstellung erhalten, die dem mit einem Konzentrationsdetektor erhaltenen Elugramm entspricht.

Als Grundlage für die Quantifizierung dient das Lambert-Beersche Gesetz (Gl. 2.11), nach dem die Absorption A proportional zur Konzentration ist (mit dem Absorptionskoeffizienten k und der Schichtdicke d).

$$A = k \cdot c \cdot d \quad (2.11)$$

Beim Auftragen des Eluats auf die Germaniumscheibe kommt es aufgrund der unterschiedlichen Probenkonzentrationen zu Variationen der Schichtdicke. Da die Schichtdicke nicht bekannt ist, wird stets die Konzentration einer Komponente zu einer anderen Komponente durch Bandenverhältnisse ausgedrückt. Dadurch ist eine relative Quantifizierung möglich.

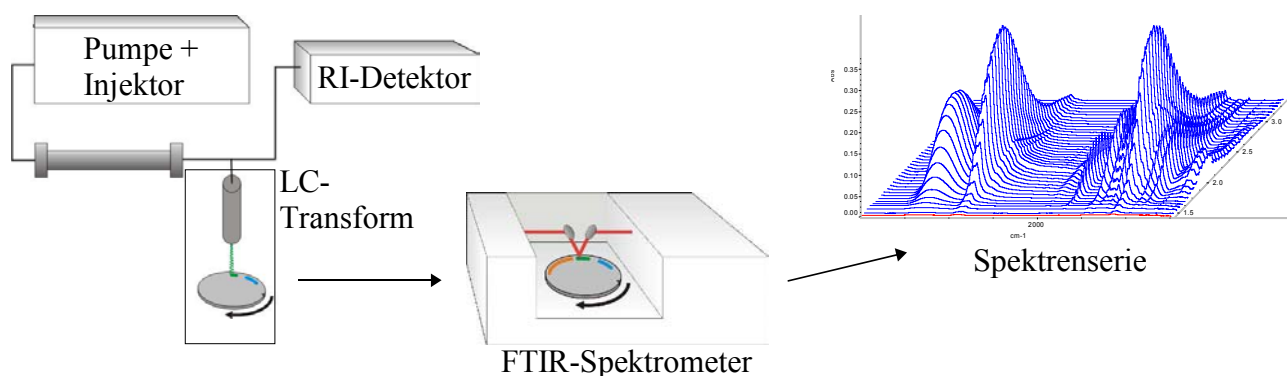


Abb. 2.5: Schema der LC-FTIR-Kopplung

Ein Schema der LC-FTIR-Kopplung mit dem als LC-Transform bezeichneten Interface ist in Abb. 2.5 dargestellt.

Eine weitere Kopplung der Flüssigchromatographie mit einer spektroskopischen Methode ist die online-Kopplung mit der NMR, jedoch ist diese mit einem sehr großen apparativen und finanziellen Aufwand verbunden. Da zudem die Methodenentwicklung sehr aufwendig ist, gibt es bisher nur einige wenige Anwendungen für die Polymeranalytik.^[49]

3 Entwicklung von SEC-Methoden für hydrophile statistische Copolymere

3.1 Größenausschlusschromatographie für säuregruppenhaltige Copolymere

Für statistische Copolymere aus Methacrylsäure und Methacrylsäureestern gibt es bislang keine robusten SEC-Methoden. Bisher erfolgen Abschätzungen der Molmasse lediglich durch Lösungsviskosimetrie. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, eine SEC-Methode zu entwickeln, die robust und reproduzierbar wahre Molmassenverteilungen liefert und damit zur Produktkontrolle eingesetzt werden kann. Da die genannten Copolymere sowohl allein als auch in Mischungen unterschiedlicher Typen als Tablettencoatings in der Wirkstoffformulierung eingesetzt werden, soll die zu entwickelnde SEC-Methode die Möglichkeit bieten, Copolymerzusammensetzungen mit einem Methacrylsäuregehalt von bis zu 50 Gew.% unter gleichen Bedingungen zu vermessen. Methacrylsäure enthaltende Copolymere werden u.a. von der Firma Röhm GmbH & Co. KG unter dem Markennamen EUDRAGIT® vertrieben. Sie sollen in den vorliegenden Untersuchungen als Modellpolymere für die Methodenentwicklung eingesetzt werden. Eine Übersicht über die von der Firma Röhm GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellten Proben ist in Tab. 3.1 wiedergegeben.

Tab. 3.1: Übersicht über die anionischen Copolymere vom Typ EUDRAGIT® und ihre Zusammensetzung (MAS: Methacrylsäure, MMA: Methylmethacrylat, MA: Methylacrylat, EA; Ethylacrylat)

Interne Bezeichnung	Produktname	durch Viskosimetrie ermittelter Molmassenbereich	MAS in Gew. %	MMA in Gew. %	MA in Gew. %	EA in Gew. %
A	S 100	50.000-100.000	30	70	-	-
B	L 100	100.000-200.000	50	50	-	-
C	L 100-55	100.000-300.000	50	-	-	50
D	NE 30D	500.000-1.000.000	-	30	-	70
E	FS 30D	100.000-500.000	10	25	65	-

Bei der einzigen literaturbekannten Molmassenbestimmungsmethode von P(MMA-co-MAS)-Copolymeren durch SEC werden die Methacrylsäuregruppen in einem ersten Schritt mit Diazomethan verestert.^[10] Das durch die Methylierung entstandene PMMA kann auf einem Standardsäulensatz aus Styrol-Divinylbenzol (SDV) mit Tetrahydrofuran (THF) als Eluent vermessen werden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen soll nun eine SEC-Methode entwickelt werden, mit der die Copolymere direkt ohne Derivatisierung analysiert werden können.

Zunächst waren die wahren Molmassen der vorliegenden Copolymere nicht bekannt, deshalb wurden die Proben mit Diazomethan umgesetzt und die erhaltenen neutralen Poly(methacrylsäureester) durch Standard SEC (SDV, THF, PMMA-Kalibrierung) charakterisiert.

Da bei der Messung der methylierten Proben in THF enthalpische Wechselwirkungen ausgeschlossen werden können, sollten die erhaltenen Molmassenverteilungen als Referenz für die zu erarbeitende direkte Bestimmungsmethode dienen können. Ziel ist es, entsprechende Elutionsprofile und vergleichbare Molmassen für die nicht methylierten Proben zu erhalten.

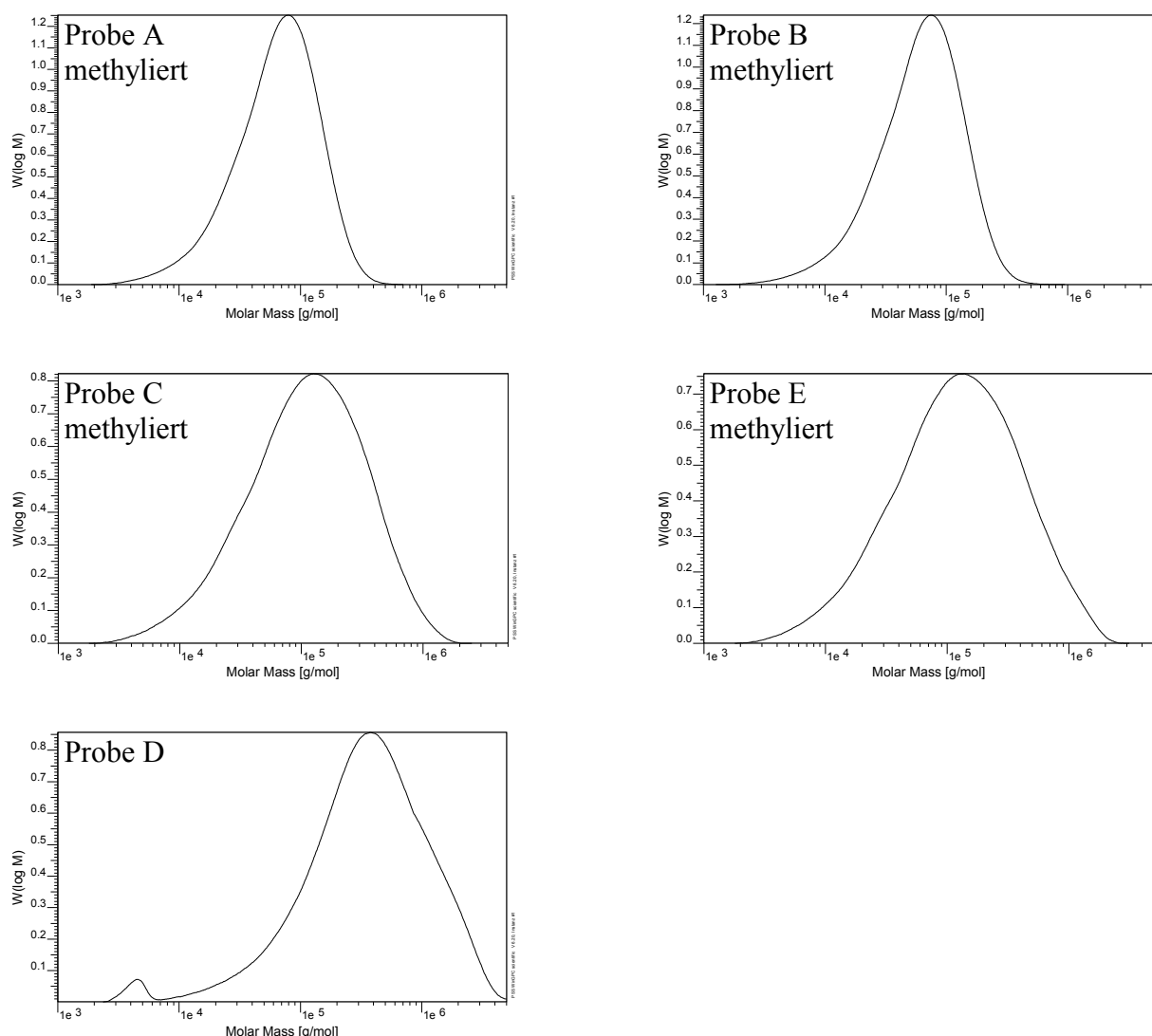


Abb. 3.1: Molmassenverteilungen der methylierten Proben A, B, C und E sowie von Probe D; stationäre Phase: PL Gel Mixed B+C+D, mobile Phase: THF, Detektor: RI

Abb. 3.1 zeigt, dass die Proben weitgehend einheitliche Molmassenverteilungen aufweisen. Der zusätzliche niedermolekulare Peak in der Molmassenverteilung von Probe D wird durch den in der

Probe enthaltenen Emulgator hervorgerufen. Bei den in Tab. 3.2 aufgeführten Werten ist der Emulgatorpeak jedoch nicht mit ausgewertet worden.

Tab. 3.2: Molmassen der methylierten (bzw. neutralen) Proben

Probe	Name	Erwartetes M_w	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	$D=M_w/M_n$
A	S 100	50.000 – 100.000	95.000	55.000	1,73
B	L 100	100.000 – 200.000	93.000	52.000	1,79
C	L 100-55	100.000 – 300.000	236.000	78.000	3,03
D	NE 30 D	500.000 – 1.000.000	730.000	252.000	2,90
E	FS 30 D	100.000 – 500.000	233.000	67.000	3,48

Die in der Tabelle Tab. 3.2 gezeigten Daten bestätigen, dass die Molmassen aller Proben in dem durch Viskositätsmessungen abgeschätzten Bereich liegen. Aus den Abbildungen und der Tabelle wird auch ersichtlich, dass die in ihrer methylierten Form als reines PMMA vorliegenden Proben A und B den geringsten Elutionsbereich und die niedrigste Polydispersität (D) aufweisen, während die acrylathaltigen Proben breiter verteilt sind. Streng genommen liefert die SEC der methylierten acrylathaltigen Proben nicht die wahren Molmassen, da P(MMA-co-EA) bzw. P(MMA-co-MA)-Copolymere einen anderen hydrodynamischen Radius haben als PMMA gleicher Molmasse. Die in Tab. 3.2 angegebenen Werte für Proben C-E sind somit nur PMMA-Molmassenäquivalente.

Unter der Voraussetzung, dass die Copolymerisation statistisch erfolgt, muss eine SEC-Methode, die diese Polymere ohne vorangehende Derivatisierung charakterisieren kann, Elutionsprofile hervorrufen, die mit denen der methylierten Proben unter Standardbedingungen in THF vergleichbar sind. Um eine entsprechende Methode zu entwickeln, muss zunächst eine geeignete mobile Phase für das Trennproblem gefunden werden. Wasser eignet sich nicht, da Proben mit einem geringeren MAS-Gehalt als 30% darin unlöslich sind. Es gibt nur zwei Lösemittel, die die Löslichkeit im ganzen Zusammensetzungsbereich gewährleisten. Dies sind *N,N*-Dimethylformamid (DMF) und *N,N*-Dimethylacetamid (DMAC). Da sich DMF durch eine hohe Instabilität und Toxizität auszeichnet, wurde DMAC als thermodynamisch gutes Lösemittel für die durchzuführenden Untersuchungen gewählt.

Für die Anwendung von DMAC für die SEC von polaren Polymeren gibt es eine DIN-Norm^[92], die folgende experimentelle Bedingungen zur Molmassenbestimmung beschreibt:

- als Elutionsmittel wird eine Lösung von 5 g/l wasserfreiem Lithiumbromid (LiBr) in DMAC benutzt,
- die Analysen werden bei 80 °C durchgeführt,

- als Detektor wird ein Differentialrefraktometer (RI-Detektor) vorgeschrieben,
- es wird keine stationäre Phase vorgegeben.

Unter diesen Bedingungen sollen die folgenden Messungen durchgeführt werden. In einer ersten Testserie wurden Untersuchungen bezüglich eines geeigneten Säulenmaterials durchgeführt. Dabei wurden eine unpolare SDV- und eine polare HEMA-Phase (Hydroxyethylmethacrylat) getestet. Für die HEMA-Phase wurde als Eluent entsprechend der DIN-Norm DMAC + 5 g/l LiBr verwendet. Für die SDV-Phase wurde eine Variation des Salzgehaltes zwischen 1 g/l und 9 g/l im Eluenten getestet. In einer dritten Testreihe wurde untersucht, ob sich THF mit einem Zusatz von 0,2 Vol.% Trifluoressigsäure als Eluent eignet.

In keinem Fall konnte ein mit den methylierten Proben vergleichbares Elutionsverhalten erreicht werden. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Proben wurden entweder deformierte, bi- oder multimodale Elutionspeaks erhalten.

Da somit weder die polare HEMA- noch die unpolare SDV-Phase geeignet erschienen, wurde eine stationäre Phase mittlerer Polarität gewählt. Dieses Trennmaterial wird auf der Basis von Polyestern hergestellt und hat den Vorteil, dass sowohl organische als auch wässrige Eluenten verwendet werden können. Die Polarität des Polyesters ist so gewählt, dass eine vollständige Benetzung des Säulenmaterials sowohl mit sehr polarem Wasser als auch mit weniger polarem THF gewährleistet werden kann.

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine SEC-Säule aus diesem als GRAM bezeichneten Material verwendet. Dabei wurde eine Porosität von 3000 Å gewählt. Die Porosität ist ein Maß für den Trennbereich der stationären Phase, der im vorliegenden Fall etwa 10^3 bis $5 \cdot 10^6$ g/mol beträgt. Der Eluent und die Säulentemperatur wurden aus den Angaben der DIN-Norm^[92] übernommen.

Zusätzlich zu den anionischen Copolymeren wurden auch die methylierten Copolymere unter den gleichen Bedingungen vermessen, um einen direkten Vergleich des Einflusses der Methacrylsäuregruppen auf das Retentionsverhalten zu erhalten.

Die unter DIN-Bedingungen erhaltenen Elugramme der methylierten Proben und der Originalproben sind in Abb. 3.2 bis Abb. 3.5 dargestellt. Unabhängig von der Zusammensetzung weisen die methylierten Proben (schwarze Kurven) gleichmäßige Elutionsprofile auf, die gut mit den Messungen in THF (auf SDV) vergleichbar sind. In allen Fällen wird eine weitgehende Trennung des Polymerpeaks vom Salzpeak beobachtet. Demgegenüber zeigt schon die Probe E mit 10% Methacrylsäuregehalt (Abb. 3.2) eine deutliche Verschiebung des Polymerpeaks zu höheren

Elutionsvolumina und eine partielle Überlagerung mit dem Salzpeak. Diese Verschiebung des Polymerpeaks ist umso stärker, je höher der MAS-Gehalt des Copolymers ist. Bei einem MAS-Gehalt von 30 % (Probe A, Abb. 3.3) ist das Copolymer nur noch als Schulter im Salzpeak zu erkennen.

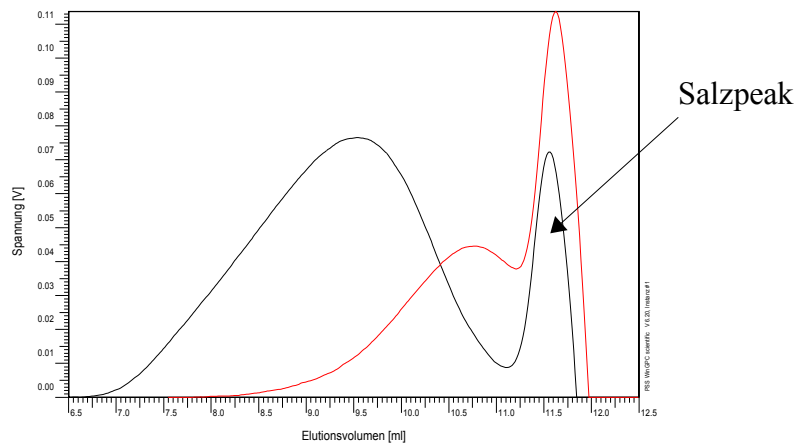


Abb. 3.2: Überlagerung der SEC-Elugramme von Probe E (10% MAS): nicht methyliert (rot), methyliert (schwarz); Eluent nach DIN-Norm

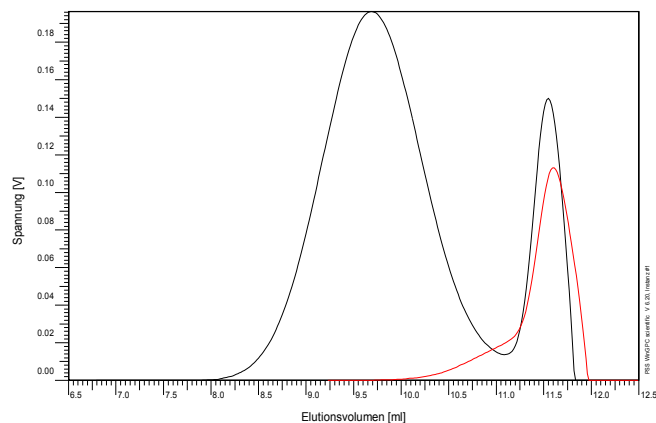


Abb. 3.3: Überlagerung der SEC-Elugramme von Probe A (30% MAS): nicht methyliert (rot), methyliert (schwarz); Eluent nach DIN-Norm

Probe B (50 % MAS, Abb. 3.4) hat die gleiche Molmasse wie Probe A, kann aber anhand des Elugramms nicht mehr identifiziert werden, da entweder keine Elution des Copolymers erfolgt, oder aber eine Coelution mit dem Salz auftritt.

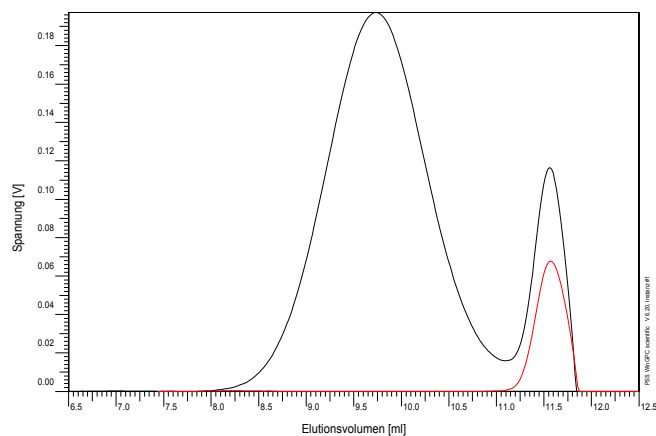


Abb. 3.4: Überlagerung der SEC-Elugramme von Probe B (50% MAS): nicht methyliert (rot), methyliert (schwarz); Eluent nach DIN-Norm

Das beobachtete chromatographische Verhalten ist auf starke adsorptive Wechselwirkungen der Methacrylsäuregruppen mit der stationären Phase zurückzuführen. Es ist nicht eindeutig nachzuweisen, ob daraus lediglich eine Verschiebung des Polymerpeaks in den Salzpeak (Coelution) resultiert oder ob Teile der Probe vollständig adsorbiert werden (keine Elution). Im Falle einer vollständigen Adsorption wäre nach einiger Zeit ein Druckanstieg der Säule und eine Verschlechterung der Trennleistung zu erwarten, was jedoch nicht beobachtet wurde.

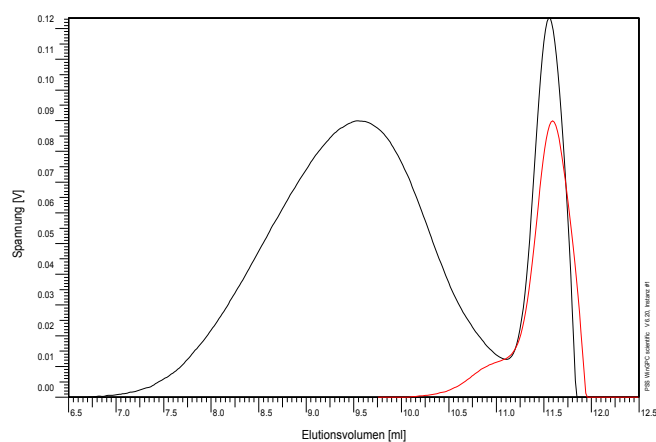


Abb. 3.5: Überlagerung der SEC-Elugramme von Probe C (50% MAS): nicht methyliert (rot), methyliert (schwarz); Eluent nach DIN-Norm

Bei Probe C (Abb. 3.5), die wie Probe B 50% MAS enthält, wird eine Schulter im Salzpeak beobachtet. Daraus kann jedoch nicht auf eine geringere Adsorption als bei Probe B geschlossen werden, da bei der Betrachtung des Elutionsvolumens auch das höhere Molekulargewicht mit einbezogen werden müsste. Ein unter gleichen Bedingungen gemessenes neutrales Copolymer

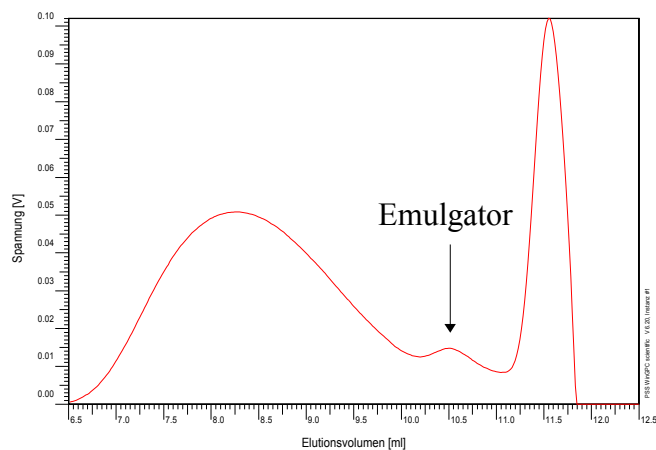


Abb. 3.6: Elugramm von Probe D (0% MAS); Eluent nach DIN-Norm

(Probe D, Abb. 3.6) zeigt wiederum ein normales Elutionsverhalten. Der Peak bei 10,5 ml Elutionsvolumen wird durch den in der Probe enthaltenen Emulgator hervorgerufen.

Der in der DIN-Norm beschriebene Eluent ermöglicht somit keine SEC-Trennung der zu untersuchenden anionischen Copolymere. Da die Zugabe von LiBr offenbar nicht ausreicht, um enthalpische Wechselwirkungen mit der stationären Phase und andere SEC-fremde Effekte zu unterdrücken, sollte im Weiteren versucht werden, die Polarität der Carboxylgruppen herabzusetzen. Dies kann durch eine Verringerung des Dissoziationsgrades durch Erniedrigung des pH-Wertes des Eluenten erreicht werden. Um zu überprüfen, welchen Einfluss dies auf das Elutionsverhalten der Copolymeren im gegebenen System hat, wird dem Eluenten Essigsäure (AcOH) in einer Konzentration von 50 mM (mmol/l) zugesetzt.

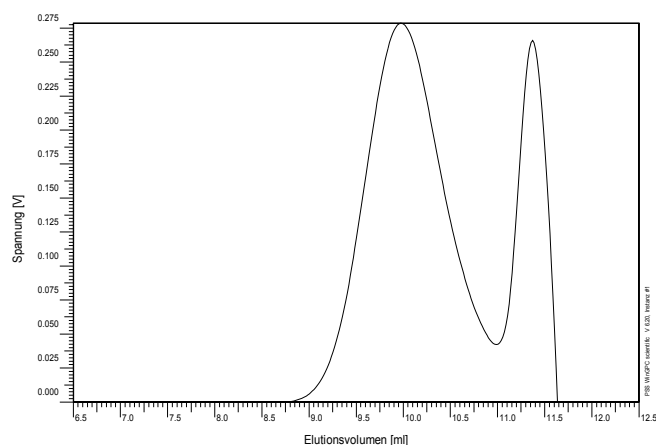


Abb. 3.7: Elugramm von Probe A (30% MAS) mit 5 g/l LiBr und 50 mM AcOH

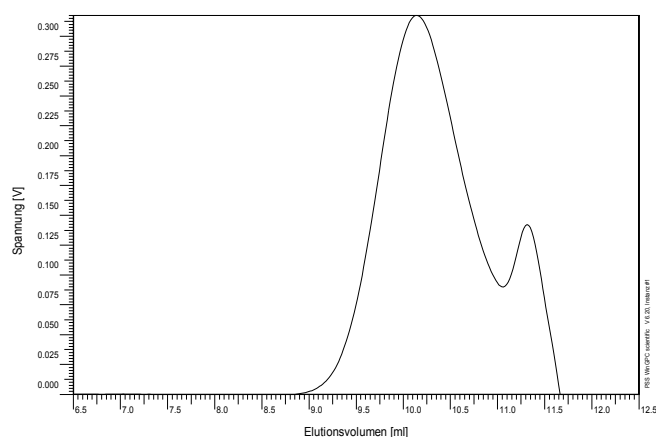


Abb. 3.8: Elugramm von Probe B (50% MAS) mit 5 g/l LiBr und 50 mM AcOH

In Abb. 3.7 bis Abb. 3.10 ist zu erkennen, dass eine Verschiebung des Polymerpeaks zu geringeren Elutionsvolumina hin erfolgt und eine zunehmende Trennung von Polymer- und Salzpeak erreicht wird. Diese Verschiebung der Elutionsvolumina ist abhängig vom MAS-Gehalt der Probe. Ein Vergleich der Elugramme von Probe A (30 % MAS) und B (50 % MAS), die jeweils gleiche Molmassen haben, zeigt, dass Probe B deutlich später eluiert als A. Dies lässt darauf schließen, dass immer noch adsorptive Wechselwirkungen mit der stationären Phase stattfinden. Weiterhin fällt auf, dass die acrylathaltigen Copolymere (Abb. 3.9 und Abb. 3.10) wesentlich breitere Elutionspeaks aufweisen als die reinen P(MMA-co-MAS)-Copolymere.

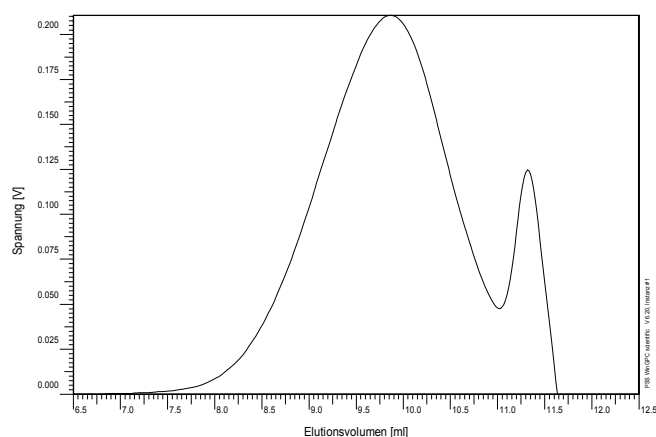


Abb. 3.9: Elugramm von Probe C (50% MAS) mit 5 g/l LiBr und 50 mM AcOH

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass bei Verwendung eines Eluenten nach DIN-Norm starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase auftreten, die bereits durch Zugabe geringer Mengen an Essigsäure verringert werden können.

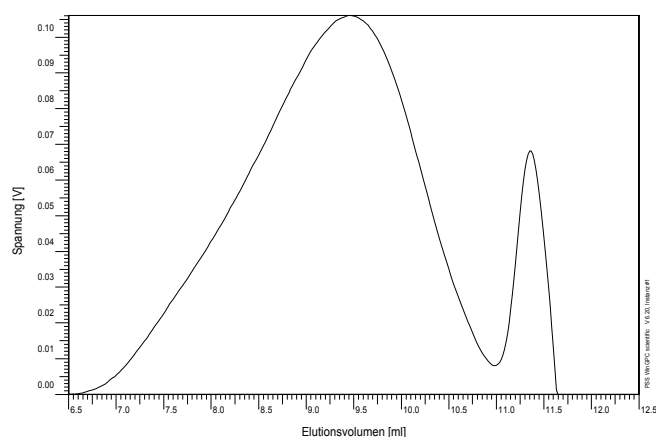


Abb. 3.10: Elugramm von Probe E (10% MAS) mit 5 g/l LiBr und 50 mM AcOH

Um eine Vereinfachung der Bedingungen zu erreichen, sollte im Folgenden überprüft werden, ob bei ausreichender AcOH-Konzentration auf die Zugabe des Salzes LiBr verzichtet werden kann. Dies hätte den Vorteil, dass einerseits die Zusammensetzung des Eluenten vereinfacht würde und andererseits die Gefahr der Salzausblühungen und Verkrustungen in der HPLC-Anlage, insbesondere an der Pumpe, nicht mehr gegeben wäre. Da derartige Ablagerungen zu einer Beschädigung des Systems führen können, muss bei salzhaltigen Eluenten stets eine Kolbenhinterspülung für die Pumpe installiert sein, um die Bildung von Verkrustungen zu reduzieren.

Beginnend bei einer Konzentration von 50 mM AcOH in DMAC wurde die Konzentration schrittweise um 50 mM bis auf 300 mM erhöht. Dabei wurde beobachtet, dass die beiden P(MMA-co-MAS)-Copolymere zunächst ein bimodales Verhalten aufweisen und ab einer Konzentration von 150 mM einheitlich und bei niedrigeren Elutionsvolumina eluieren. In Abb. 3.11 sind die Elugramme der P(MMA-co-MAS)-Copolymere bei einer AcOH-Konzentration von 200 mM überlagert. Die Probe B mit 50% MAS zeigt noch eine leichte Schulter bei etwa 8 ml. Die Verschiebung der Peaks zu geringeren Elutionsvolumina kann in einer Aufweitung der Knäuel durch intramolekulare Wechselwirkungen, aber auch in Aggregatbildung begründet sein.

Wesentlich deutlicher wirken sich diese Effekte bei den acrylathaltigen Copolymeren aus. Hier werden bei allen AcOH-Konzentrationen bimodale Verteilungen beobachtet.

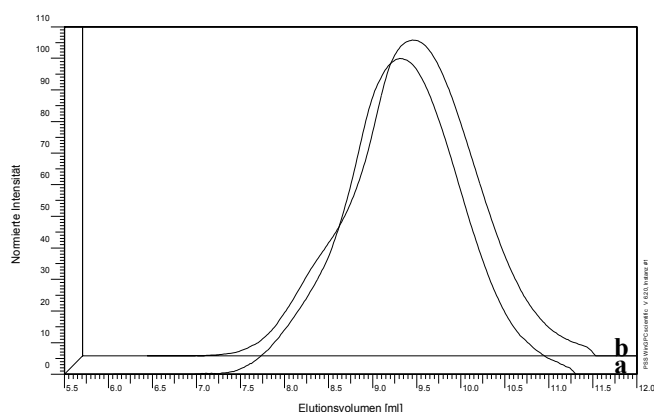


Abb. 3.11: Überlagerung der Elugramme von Probe A (30% MAS, a) und Probe B (50% MAS, b)
Eluent: DMAC + 200 mM AcOH, ohne LiBr

In Abb. 3.12 ist zu erkennen, dass die Copolymere C und E deutliche Schultern bei niedrigen Elutionsvolumina aufweisen, die in dem Bereich liegen, in dem die hochmolekulare Probe D eluiert. Offenbar werden bei den acrylathaltigen anionischen Proben ohne LiBr im Eluenten hochmolekulare Aggregate gebildet, die den SEC-Mechanismus stören.

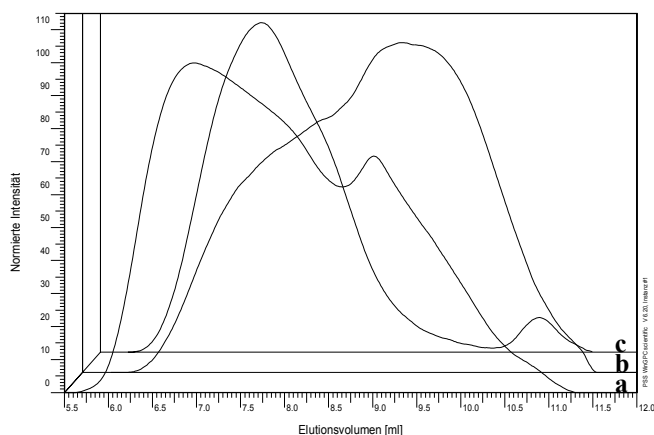


Abb. 3.12: Überlagerung der Elugramme von Probe C (50% MAS, a), Probe E (10% MAS, b) und Probe D (0% MAS, c) – Eluent: DMAC + 200 mM AcOH, ohne LiBr

Durch die erneute Zugabe von LiBr zum Eluenten aus DMAC und AcOH wird eine Verbesserung des Elutionsverhaltens aller Copolymere erreicht. Es erscheint somit unerlässlich, dem Eluenten sowohl AcOH als auch LiBr zuzusetzen.

Im Verlauf der Untersuchungen wurde beobachtet, dass durch gleichzeitige Zugabe von hohen Säure- und Salzkonzentrationen bereits nach wenigen Stunden bis Tagen eine Gelbfärbung des Eluenten auftritt. Diese Veränderung des DMAC wird auch durch die Temperierung der SEC-Säulen auf 80 °C begünstigt. Diesem Effekt kann durch Erniedrigung der Säulentemperatur auf

60°C entgegengewirkt werden. Eine weitere Verringerung der Temperatur würde durch eine höhere Viskosität des DMAC den Gegendruck der SEC-Säule zu stark erhöhen.

Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse wurden drei Modifikationen am System vorgenommen:

- die Säulentemperatur wurde auf 60 °C gesenkt,
- die AcOH- und LiBr-Konzentrationen wurden so optimiert, dass bei einer möglichst geringen Belastung des Systems ein idealer Größenausschlussmechanismus gewährleistet werden kann,
- zusätzlich zu der verwendeten SEC-Säule (GRAM, 3000 Å) wurde eine weitere GRAM-Säule mit einer Porosität von 100 Å eingesetzt, um die Trennleistung im niedermolekularen Bereich so weit zu erhöhen, dass keine Überlappung des Polymerpeaks mit dem Salzpeak mehr erfolgt.

Es wurde festgestellt, dass bereits eine Konzentration von 3 g/l LiBr ausreicht, um gleichmäßige Elutionsprofile zu erhalten. Anhand des Verhaltens der P(MMA-co-MAS)-Copolymere kann die optimale AcOH-Konzentration eingestellt werden. Da beide Copolymere sich nur in ihrem MAS-Gehalt unterscheiden, sollte das ideale Elutionsverhalten dann erreicht sein, wenn die Proben A und B coeluierten. In Abb. 3.13 sind exemplarisch die Elugramme der methylierten und nicht methylierten Spezies bei zwei verschiedenen AcOH-Konzentrationen (50 und 100 mM) in einer Überlagerung gezeigt.

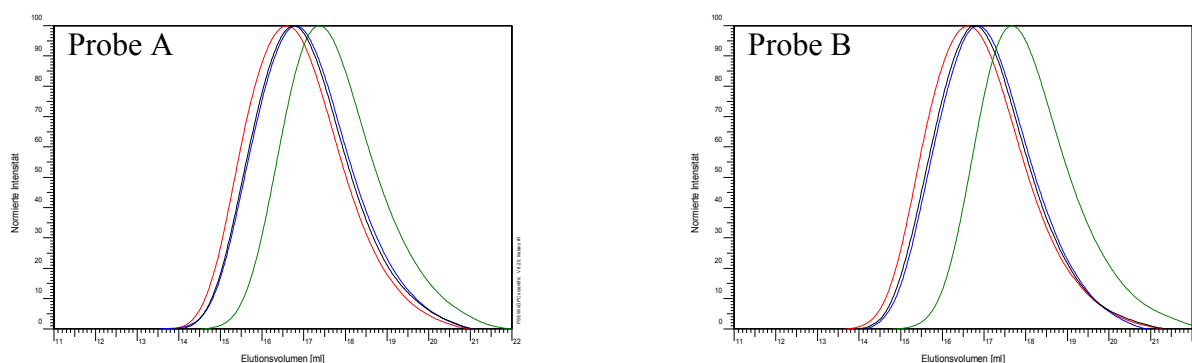


Abb. 3.13: Überlagerung der Elugramme der Proben A und B – Eluentenzusammensetzung: DMAC + 3 g/l LiBr + 50 mM AcOH: nicht methyliert (grün), methyliert (schwarz) und 100 mM AcOH: nicht methyliert (rot), methyliert (blau)

Während die methylierten Proben (schwarze und blaue Kurven) unabhängig von der Säurekonzentration coeluierten, zeigen die Originalproben A und B bei 50 mM noch eine deutliche Verschiebung zu höheren Elutionsvolumina. Dies ist ein Hinweis darauf, dass 50 mM AcOH noch nicht für einen idealen SEC-Mechanismus genügen. Bei 100 mM AcOH im Eluenten wird die erwünschte Coelution von Probe A und Probe B erreicht. Die methylierten und nicht methylierten Copolymere eluieren nahe beieinander. Abweichungen im Elutionsvolumen können dadurch

begründet werden, dass die Copolymere unterschiedliche funktionelle Gruppen (Methylester und Carboxylgruppen) tragen, die Unterschiede im hydrodynamischen Volumen hervorrufen. Wichtig ist hier in erster Linie, dass die Peakformen übereinstimmen. Dies ist bei einem Eluenten aus DMAC mit 3 g/l LiBr und 100 mM AcOH der Fall, und trifft auch auf die Proben C und E (Abb. 3.14) zu.

Dies bedeutet, dass mit der vorliegenden Eluentenzusammensetzung geeignete chromatographische Bedingungen für die SEC der untersuchten Proben gegeben sind. Auf der Basis dieses Eluenten wurden nun noch weitere Anpassungen und Untersuchungen zur Optimierung und Prüfung des Systems durchgeführt.

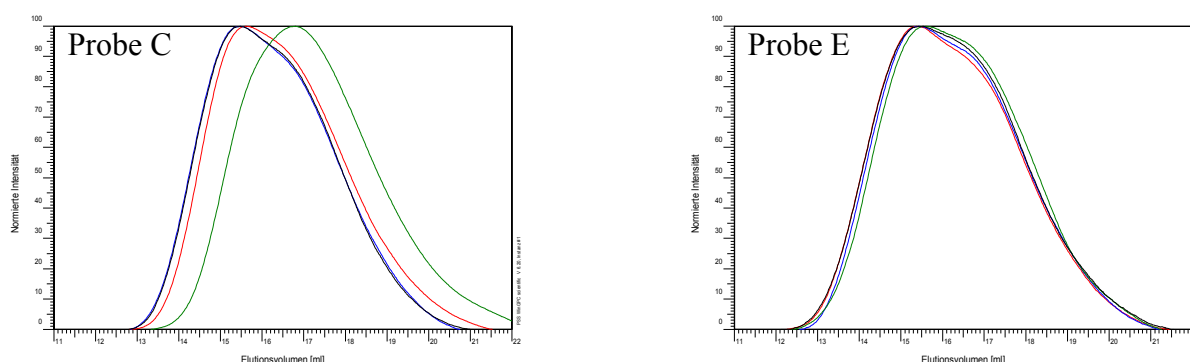


Abb. 3.14: Überlagerung der Elugramme von Probe C und E – Eluentenzusammensetzung: DMAC + 3 g/l LiBr + 50 mM AcOH: grün: nicht methyliert, schwarz: methyliert, bzw. 100 mM AcOH: rot: nicht methyliert, blau: methyliert

Es fällt auf, dass sowohl Probe C als auch Probe E bei etwa 16 ml einen deutlichen Knick im Elugramm aufweisen. Dies war bei den zuvor durchgeführten Messungen auf nur einer Säule (GRAM 3000 Å) nicht der Fall. Da dieses Phänomen sowohl bei den methylierten als auch bei den nicht methylierten Proben und immer beim gleichen Elutionsvolumen auftritt, wird es auf die verwendete Säulenkombination zurückgeführt. Nach Rücksprache mit dem Hersteller wurden die Säulen der Porositäten 3000 und 100 Å durch eine Linearsäule vom Typ XL ersetzt, in der eine breite Porositätsverteilung vorliegt und die ein einheitliches Elutionsprofil über den benötigten Molmassenbereich ermöglicht.

Um aus den erhaltenen Elugrammen Molmassenverteilungen für die Copolymere zu errechnen, muss eine Kalibrierung mit geeigneten, gut charakterisierten Polymerstandards durchgeführt werden. Da für die untersuchten Copolymere keine entsprechenden Standards existieren, ist nur eine relative Auswertung, beispielsweise mit einer PMMA-Kalibrierung möglich. Bei den erhaltenen Werten handelt es sich dann aber nicht um absolute Molmassenwerte, sondern lediglich um PMMA-Molmassenäquivalente.

Im nächsten Schritt soll die Vergleichbarkeit der durch die PMMA-Kalibration erhaltenen Molmassenäquivalente mit den wahren Molmassen überprüft werden. Aus diesem Grund wird die SEC mit einem Durchflusslichtstreugerät gekoppelt. Der Mehrwinkellichtstredetektor als molmassensensitiver Detektor in der SEC ermöglicht es, die Molmassenverteilung ohne substanzspezifische Kalibration zu ermitteln. Zusätzlich kann anhand der durch die Lichtstreuung erhaltenen Kurve der Molmasse als Funktion vom Elutionsvolumen überprüft werden, ob die chromatographische Trennung nach einem SEC-Mechanismus verläuft. Das ist der Fall, wenn die Auftragung näherungsweise eine lineare Funktion $\log M = f(V_E)$ ergibt.

In die Molmassenberechnung durch Lichtstreuung gehen neben dem Lichtstreusignal die Parameter Detektorkonstante, injizierte Probenmenge und Brechungsindexinkrement ein. Bei gegebener Detektorkonstante kann mit der Software des Lichtstreugerätes die Probenmenge oder aber das Brechungsindexinkrement berechnet werden. Eine dieser beiden Größen muss jedoch vorher bekannt sein. Eine offline-Bestimmung von dn/dc ist im vorliegenden Fall nicht möglich, da hierfür zunächst eine Dialyse der Probenlösung durchgeführt werden müsste und keine DMAC-beständigen Dialysemembranen existieren. Nach Brüssau^[77] kann das Eluat nach der SEC als dialysiert betrachtet werden, da während der Chromatographie eine Einstellung des Donnan-Gleichgewichtes erfolgt. Die injizierte Probenmenge kann aus der Konzentration der Probenlösung und dem Injektionsvolumen errechnet werden. Die Probenlösung wird jedoch filtriert, bevor sie injiziert wird. Da die Proben D und E bei der Filtration einen hohen Gegendruck aufbauen, lässt dies auf nicht filtrierbare Anteile schließen. Aus diesem Grund ist die tatsächliche injizierte Probenmenge geringer als die errechnete Probenmenge, und die durch die Lichtstreuung bestimmten Molmassen werden für diese Proben ungenau. Die Molmassenbestimmung für die gut filtrierbaren Proben A, B und C sollte jedoch zuverlässige Ergebnisse liefern.

In Abb. 3.15 sind die aus der Lichtstrekopplung erhaltenen Molmassen als Funktion des Elutionsvolumens im SEC-Elugramm dargestellt. Der einheitliche Verlauf der Molmassenkurve bestätigt, dass die Chromatographie im vorliegenden Fall tatsächlich im Größenausschlussmodus erfolgt. Die durch die Lichtstrekopplung erhaltenen M_w -Werte für die Proben A bis D sind in Tab. 3.3 den Werten gegenübergestellt, die für die methylierten Proben erhalten wurden.

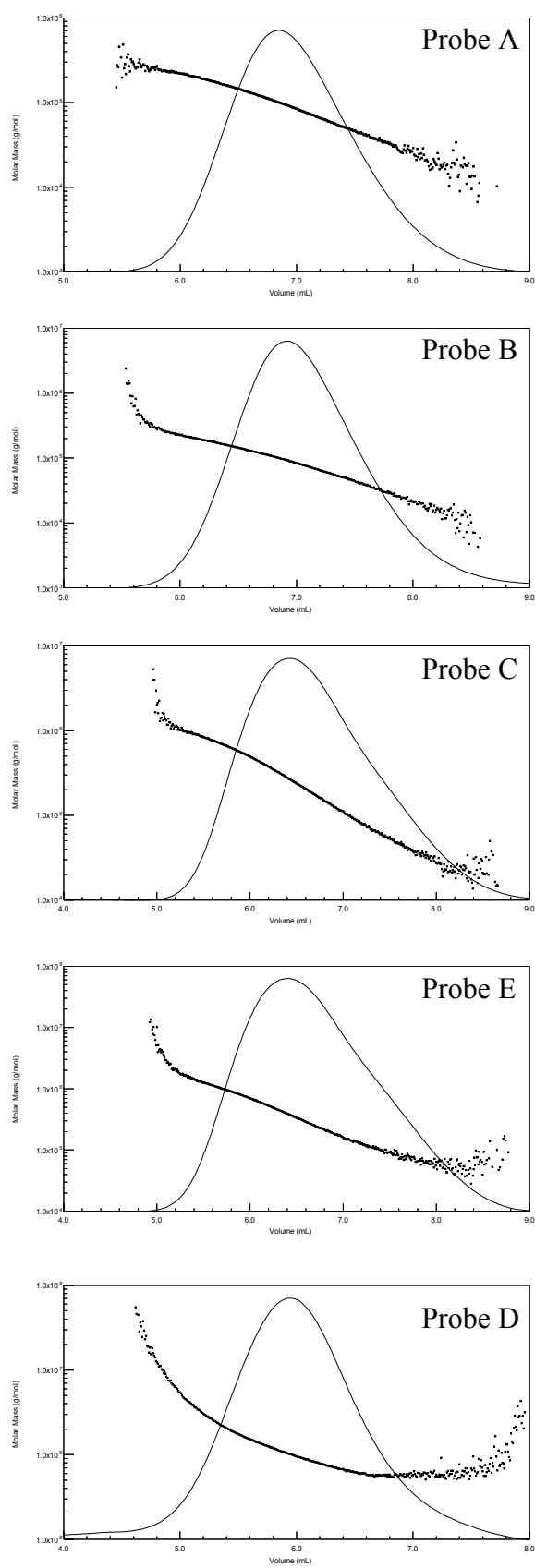


Abb. 3.15: SEC-Elugramme der Proben A, B, C, E und D mit RI- und MALLS-Detektion

Tab. 3.3: Vergleich der M_w -Werte aus der SEC-MALLS-Kopplung mit denen der methylierten Proben (beides auf GRAM XL gemessen)

Probe	M_w (g/mol) methyliert	M_w (g/mol) SEC-MALLS	dn/dc (ml/g)
A	95.000	100.000	0,07
B	90.000	90.000	0,08
C	270.000	245.000	0,07
D	808.000	732.000	0,04
E	271.000	306.000	0,05

Die bisher erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass es gelungen ist, eine SEC-Methode für methacrylsäurehaltige PMMA-Copolymere variabler Zusammensetzung zu entwickeln. Die Robustheit der Methode sollte nun anhand von Langzeittests und durch einen Ringtest in drei unterschiedlichen Laboratorien überprüft werden. Die Langzeittests wurden in der Firma Röhm GmbH & Co. KG durchgeführt, der Ringtest bei der Polymer Standards Service GmbH (PSS), bei der Röhm GmbH & Co. KG und am Deutschen Kunststoff-Institut (DKI).

Die drei genannten Laboratorien führten den einwöchigen Ringtest mit einer GRAM linear XL-Säule unter zuvor festgelegten Bedingungen durch. Dabei wurden HPLC-Anlagen unterschiedlicher Hersteller eingesetzt. Während die Testpartner über einen Autosampler injizierten, erfolgte die Injektion am DKI manuell. Es wurden in allen drei Fällen die gleichen PMMA-Kalibrierstandards und die gleiche Software (WinGPC der Firma PSS) verwendet.

Die erhaltenen Ergebnisse für die Proben A, B und C sind nachfolgend in Säulendiagrammen (Abb. 3.16 bis Abb. 3.18) dargestellt. Dabei sind jeweils die M_w -Werte von täglich frisch angesetzten Probenlösungen der wiederholt injizierten Lösung vom ersten Tag gegenübergestellt.

Die Betrachtung der Säulendiagramme zeigt, dass laborbedingt die Werte geringfügig schwanken. Die Abweichungen liegen jedoch alle in einem Bereich von ± 5 %, der sogar der Toleranz für Wiederholungsmessungen im selben Labor entspricht. Die Ergebnisse am DKI zeigen mit der manuellen Injektion die größten Abweichungen.

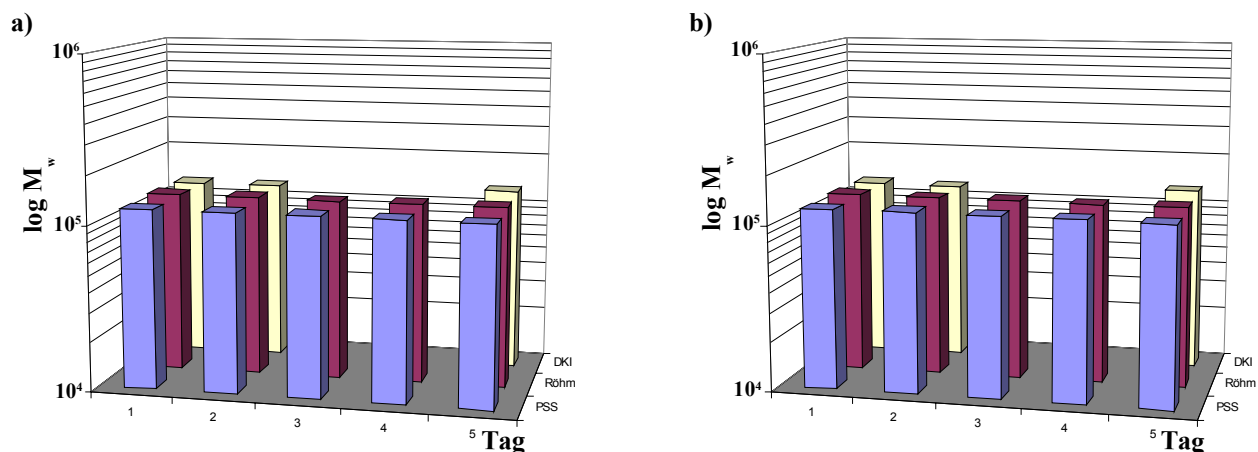


Abb. 3.16: Ergebnisse des Ringtests für Probe A, a) Doppelinjektion frischer Lösungen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, b) Doppelinjektion der Probenlösung vom ersten Tag; stationäre Phase: GRAM linear XL, mobile Phase: DMAC + 3 g/L LiBr + 100 mM AcOH

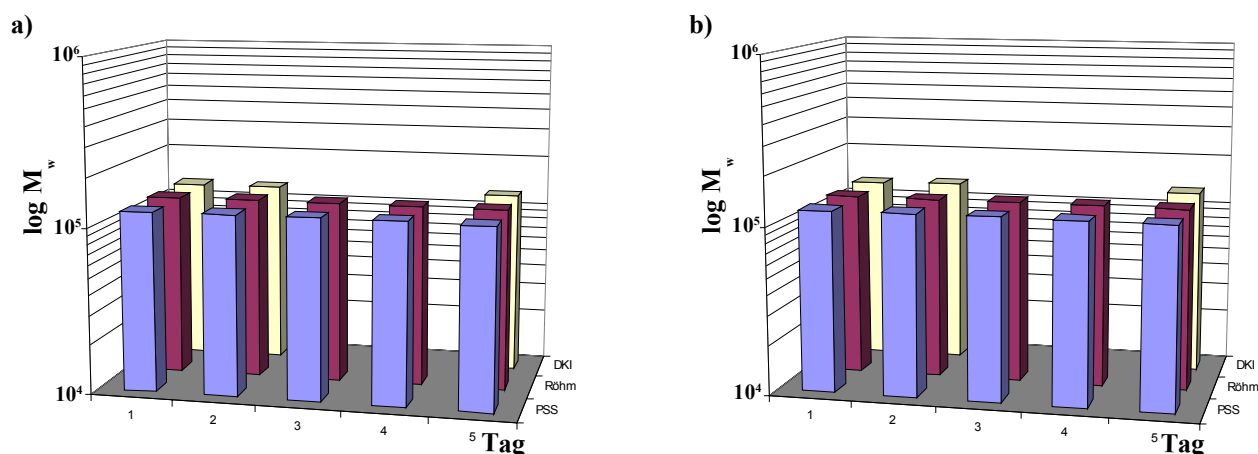


Abb. 3.17: Ergebnisse des Ringtests für Probe B, a) Doppelinjektion frischer Lösungen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, b) Doppelinjektion der Probenlösung vom ersten Tag; stationäre Phase: GRAM linear XL, mobile Phase: DMAC + 3 g/L LiBr + 100 mM AcOH

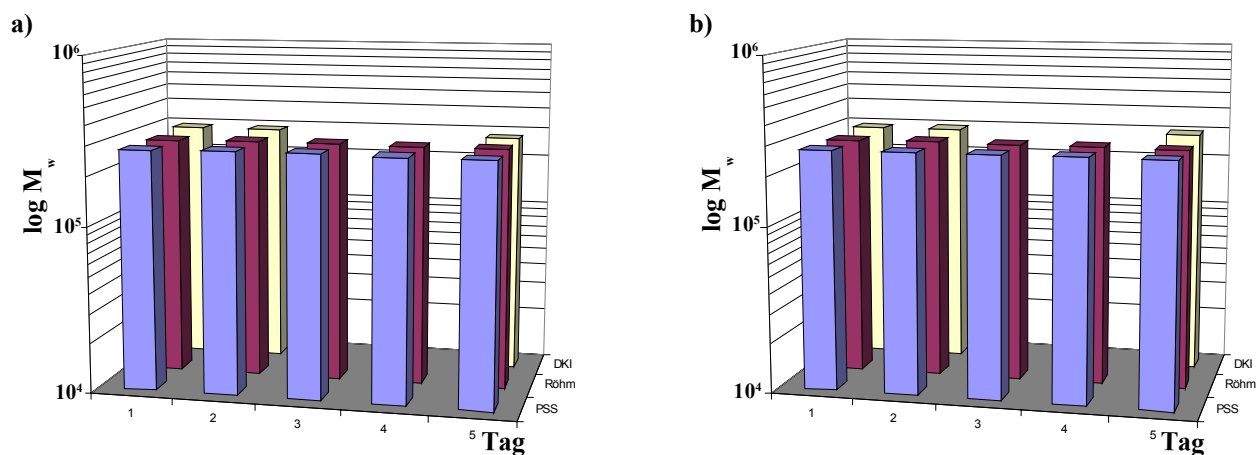


Abb. 3.18: Ergebnisse des Ringtests für Probe C, a) Doppelinjektion frischer Lösungen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, b) Doppelinjektion der Probenlösung vom ersten Tag; stationäre Phase: GRAM linear XL, mobile Phase: DMAC + 3 g/L LiBr + 100 mM AcOH

Wie gut die SEC-Messungen der verschiedenen Laboratorien sind, wird anhand der Überlagerung der Molmassenverteilungen deutlich. In Abb. 3.19 sind für die Proben A, B und C jeweils zwei Verteilungen jedes Laboratoriums überlagert.

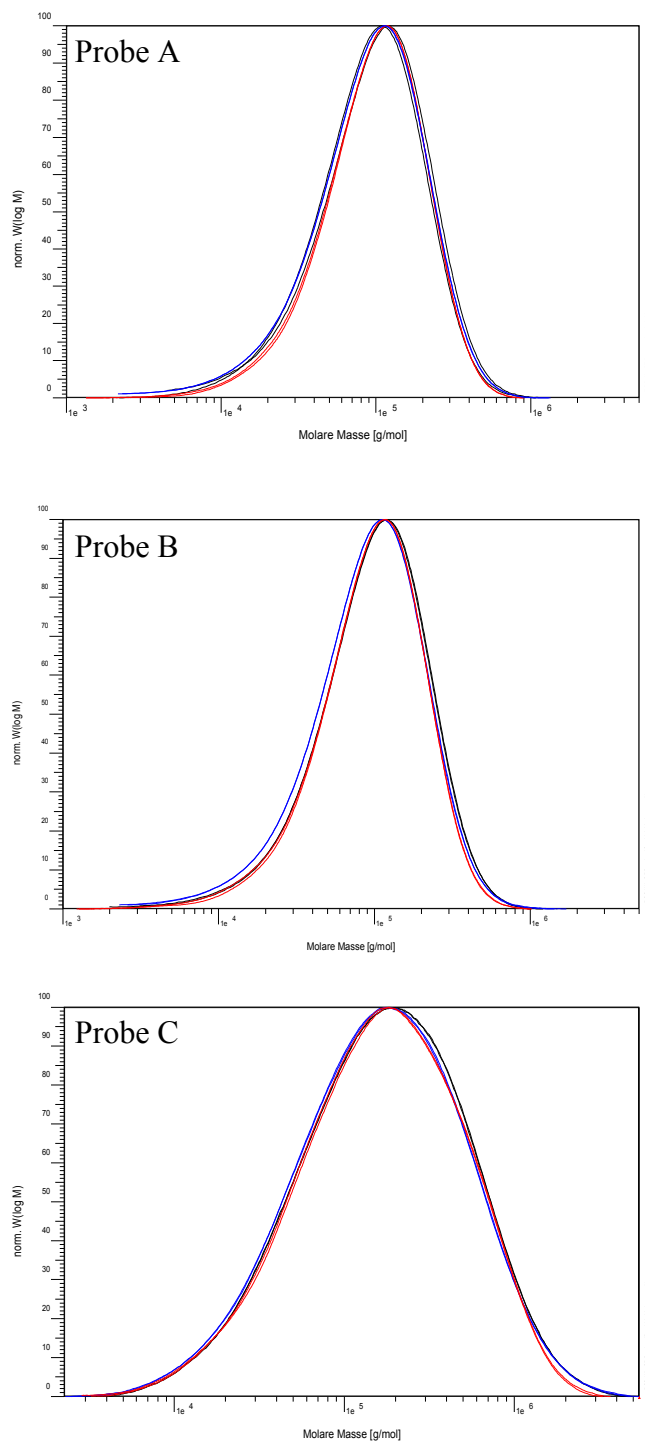


Abb. 3.19: Überlagerung der in drei Laboratorien erhaltenen Molmassenverteilungen für die Proben A, B und C: DKI (schwarz, 1 GRAM linear XL Säule), PSS (blau, 1 GRAM linear XL Säule), Röhm (rot, 2 GRAM linear XL Säulen)

Neben der Reproduzierbarkeit der durchgeführten Messungen ist auch eine ausreichende Trennleistung des chromatographischen Systems erforderlich. Die Anforderung des Systems in Bezug auf die Trennleistung wird nach DIN^[92] wie folgt definiert: der Quotient aus der Elutionsvolumendifferenz pro Molmassenpotenz und der Querschnittsfläche der Säule muss grösser als $6 \text{ cm}^3/\text{cm}^2$ sein.

Für einen Säulendurchmesser von 8 mm ergibt sich daraus eine Volumendifferenz von mindestens 3,0 ml pro Molmassenpotenz. Diese Steigung wird mit nur einer GRAM linear XL-Säule überschritten (Abb. 3.20).

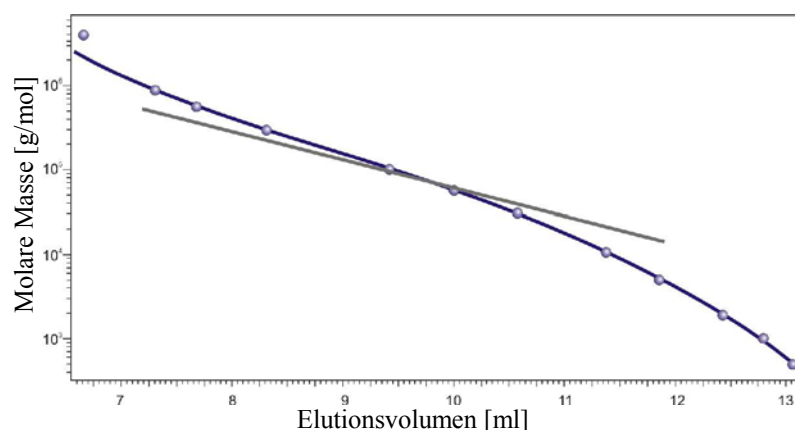


Abb. 3.20: PMMA-Kalibration mit einer GRAM linear XL-Säule; eingezeichnete Gerade: maximale geforderte Steigung der Kurve

Aus diesem Grund wurden weitere Messungen mit einem Säulensatz aus zwei GRAM linear XL-Säulen durchgeführt. Die zugehörige Kalibrationskurve in Abb. 3.21 zeigt, dass hier die geforderte Steigung eingehalten werden kann.

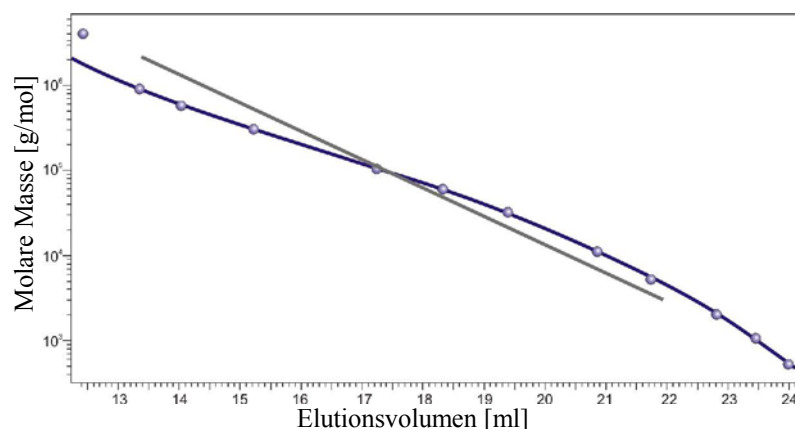


Abb. 3.21: PMMA-Kalibration mit 2 GRAM linear XL-Säulen; eingezeichnete Gerade: maximale geforderte Steigung der Kurve

In Zusammenarbeit mit der Firma Röhm wurde eine Statistik für die Messungen mit der entwickelten Methode aufgestellt. Dabei wurde gezeigt, dass für die Doppelbestimmung der Proben A bis E an 14 aufeinanderfolgenden Tagen gleichbleibende Ergebnisse erzielt werden. Eine

Auftragung der erhaltenen M_w -Werte ist in Abb. 3.22 graphisch dargestellt. Eine statistische Betrachtung erfolgt in Tab. 3.4. Die Ergebnisse zeigen eine sehr gute Reproduzierbarkeit. Eine Ausnahme bildet Probe D. Durch das sehr breite Elutionsprofil haben bereits kleine Abweichungen bei der Basislinienkorrektur des Elugramms einen großen Einfluss auf das M_w .

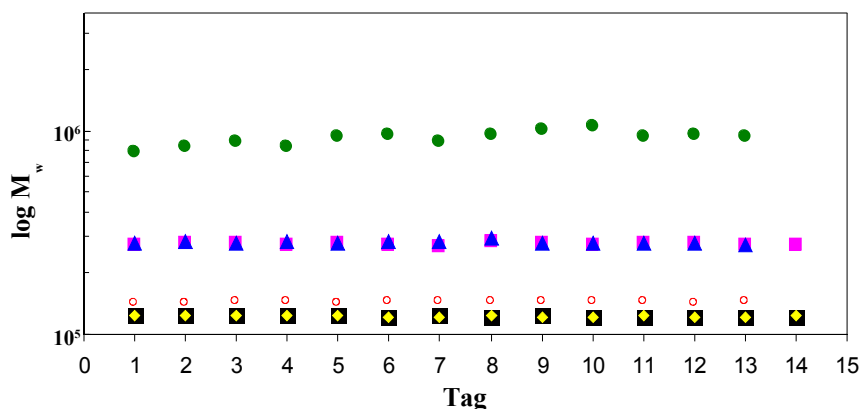


Abb. 3.22: M_w -Werte des Langzeittests für die Proben A (■), B (◆), C (◼), D (●), E (▲) und ein als Referenz gemessenes PMMA (○); stationäre Phase: 2 GRAM linear XL-Säulen, mobile Phase: DMAC + 3 g/L LiBr + 100 mM AcOH, Detektor: RI

Tab. 3.4: Statistik des Langzeittests bei der Firma Röhm (aus jeweils 14 Doppelinjektionen); chromatographische Bedingungen wie in Abb. 3.22

	Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E
Mittleres M_w [g/mol]	123.000	123.000	278.000	918.000	283.000
Standardabweichung	1.220	840	2.770	73.350	4.670
Variationskoeffizient (%)	0,99	0,68	1,00	7,99	1,65

Der Ringtest und der Langzeittest haben gezeigt, dass die entwickelte Methode in verschiedenen Laboratorien reproduzierbare und für alle Proben auch nach Wochen gleichbleibende Ergebnisse gewährleistet. Der letzte Schritt ist nun ein Vergleich der auf verschiedene Arten erhaltenen Molmasseninformationen für die Proben. Die entsprechenden gewichtsmittleren Molmassen sind in Abb. 3.23 und in Tab. 3.5 gegenübergestellt. Einmal sind dies die Ergebnisse aus der THF-Standard GPC, bei der die methylierten Proben vermessen wurden. Die anderen Werte beziehen sich auf Messungen mit dem System GRAM / DMAC + 3 g/L LiBr + 100 mM AcOH. Dabei wurden die methylierten Proben untersucht und mit einer konventionellen PMMA-Kalibration ausgewertet, weiterhin wurden die Molmassen der nicht methylierten Originalproben durch SEC-Lichtstreuung bestimmt und schließlich mit einer konventionellen PMMA-Kalibration verglichen.

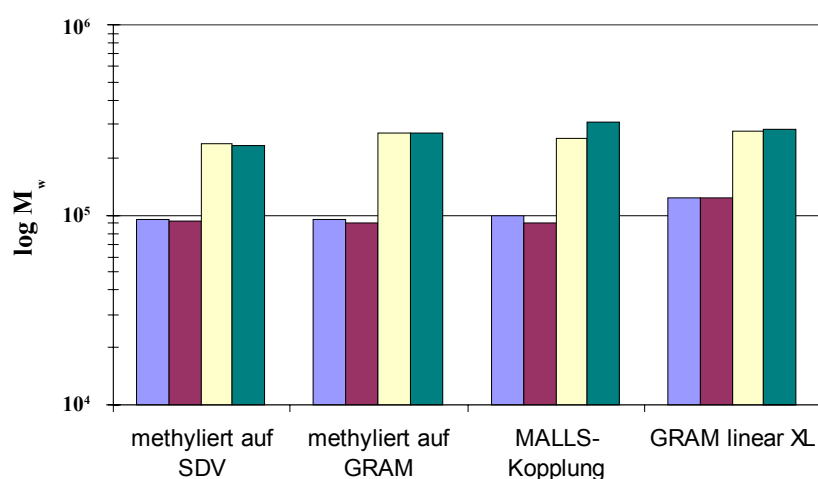


Abb. 3.23: Vergleich der ermittelten M_w -Werte für die Proben A (blau), B (rot), C (gelb) und E (grün)

Tab. 3.5: Tabellarischer Vergleich der ermittelten M_w -Werte

Probe	methyliert auf SDV	methyliert auf GRAM	MALLS-Kopplung	GRAM linear XL
A	95.000	95.000	100.000	123.000
B	93.000	90.000	90.000	123.000
C	236.000	270.000	254.000	278.000
E	233.000	271.000	306.000	283.000

Für die Proben A bis E ist eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben. Die mit „GRAM linear XL“ bezeichneten Werte sind die Mittelwerte des Langzeittests und liegen höher als die Vergleichswerte. Dies liegt daran, dass mit einer PMMA-Kalibrierung lediglich PMMA-Molmassenäquivalente erhalten werden. Die Knäuelaufweitung der MAS-haltigen Copolymere ist in dem verwendeten Eluenten größer als die der korrespondierenden methylierten (als PMMA vorliegenden) Proben. Da in der SEC nicht nach der Molmasse, sondern streng genommen nach hydrodynamischen Radien getrennt wird, resultieren für P(MMA-MAS)-Copolymere mit einer PMMA-Kalibration scheinbar höhere Molmassen. Diese liegen jedoch immer noch in dem Bereich, der für die methylierten Proben bzw. mit Lichtstreuung ermittelt wurde. Für Probe E ist das über Lichtstreuung ermittelte M_w durch die bereits diskutierten Filtrationsprobleme fehlerbehaftet und liegt deshalb über dem durch PMMA-Kalibration bestimmten Wert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es gelungen ist, eine robuste SEC-Methode für anionische Copolymere vom Typ P(MMA-co-MAS) sowie für entsprechende Copolymere mit einem EA- bzw. MA-Anteil zu entwickeln. Für die SEC wurde eine neue, wechselwirkungsarme stationäre Phase eingesetzt. Systematische Untersuchungen haben ergeben, dass DMAC als Eluent

geeignet ist, wenn sowohl LiBr als auch AcOH zugesetzt werden. Nur dann ist ein guter Größenausschlussmechanismus gewährleistet. Diese Methode kann für Copolymere mit einem MAS-Gehalt zwischen 0 % und 50 % eingesetzt werden und bietet die Möglichkeit, über eine PMMA-Kalibration Molmassenäquivalente zu erhalten, die abhängig von der Copolymerzusammensetzung zwischen 10 und 30 % über den wahren Molmassen liegen. Die sehr gute Reproduzierbarkeit konnte in einem Ringtest bestätigt werden. Es wurde damit die Möglichkeit geschaffen, die SEC als eine einfach zu implementierende Methode zur Bestimmung der Molmassenverteilung für diese Copolymere einzusetzen und für die Produktkontrolle zu nutzen.

3.2 Größenausschlusschromatographie für ammoniumgruppenhaltige Copolymere

Neben den im vorhergehenden Abschnitt behandelten anionischen bzw. neutralen Methacrylatcopolymeren werden auch kationische Copolymere als Dragierlacke eingesetzt. Diese werden unter den Markennamen EUDRAGIT® E 100, EUDRAGIT® RL 100 sowie EUDRAGIT® RS 100 vertrieben. EUDRAGIT® E 100 ist ein Copolymerisat mit kationischem Charakter auf der Basis von Dimethylamino-ethylmethacrylat und neutralen Methacrylsäureestern und wird für magensaftlösliche Tablettenüberzüge eingesetzt. EUDRAGIT® RL 100 und EUDRAGIT® RS 100 sind wasserunlösliche, quellbare Filmbildner auf der Basis von neutralen Methacrylsäureestern und einem geringen Anteil an Trimethylammonium-methacrylat-chlorid. Die Typen RL und RS weisen unterschiedliche Anteile an quartären Ammoniumgruppen auf, wodurch die Permeabilität der von ihnen gebildeten Filme beeinflusst wird. EUDRAGIT® RL 100 weist eine hohe, EUDRAGIT® RS 100 (mit einem geringeren Ammoniumanteil) eine geringe Permeabilität auf. Wie auch für die anionischen Copolymere, soll – nach Möglichkeit unter Verwendung der gleichen stationären Phase – eine robuste SEC-Methode für die kationischen EUDRAGIT®-Typen entwickelt werden, die in jedem Analysenlabor nachgestellt werden kann. In einer kürzlich erschienenen Publikation^[9] wird die Entwicklung einer SEC-Methode für EUDRAGIT® RL und RS in Ethanol (mit LiCl) als Eluent beschrieben. Dabei erfolgt die Molmassenbestimmung über die Kopplung der SEC mit einem Mehrwinkellichtstreuendetektor. Dies ermöglicht die Absolutbestimmung der Molmassen - kann aber nur in wenigen Laboratorien nachgestellt werden, da oft nur Standarddetektoren wie RI- und UV-Detektoren, eventuell auch verdampfende Lichtstreuendetektoren (ELSD) zur Verfügung stehen. Eine Kalibration mit PMMA-Standards ist wegen der Unlöslichkeit von PMMA in Ethanol nicht möglich.

Für die Erarbeitung der SEC-Methode standen insgesamt 11 Proben zur Verfügung, die von der Firma Röhm GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt wurden. Dies sind die beschriebenen kationischen EUDRAGIT®-Typen und zu Typ E und RL jeweils 4 Molmassenvariationen. Im Folgenden wird EUDRAGIT® E 100 vereinfachend als „kationisches“ EUDRAGIT® bezeichnet, auch wenn es zunächst als neutrales Amin vorliegt und erst vom Magensaft ionisiert wird. Die entsprechenden Proben mit ihren jeweiligen Herstellerangaben sind in Tab. 3.6 zusammengefasst:

Tab. 3.6: Übersicht über die kationischen Copolymere vom Typ EUDRAGIT®

Interne Bezeichnung	Produktname	Anteil und Typ des Aminomethacrylates	Viskositätszahl [ml/g]*
E 100	EUDRAGIT® E 100	50 % Dimethylamino-ethylmethacrylat	28,0
EA	mod. EUDRAGIT® E 100	50 % Dimethylamino-ethylmethacrylat	27,3
EB	mod. EUDRAGIT® E 100	50 % Dimethylamino-ethylmethacrylat	14,7
EC	mod. EUDRAGIT® E 100	50 % Dimethylamino-ethylmethacrylat	45,3
ED	mod. EUDRAGIT® E 100	50 % Dimethylamino-ethylmethacrylat	56,0
RL100	EUDRAGIT® RL 100	10 % Trimethylammonio-ethylmethacrylat-chlorid	26,9
RLE	mod. EUDRAGIT® RL 100	10 % Trimethylammonio-ethylmethacrylat-chlorid	25,9
RLF	mod. EUDRAGIT® RL 100	10 % Trimethylammonio-ethylmethacrylat-chlorid	13,7
RLG	mod. EUDRAGIT® RL 100	10 % Trimethylammonio-ethylmethacrylat-chlorid	64,3
RLH	mod. EUDRAGIT® RL 100	10 % Trimethylammonio-ethylmethacrylat-chlorid	38,9
RS100	EUDRAGIT® RS 100	5 % Trimethylammonio-ethylmethacrylat-chlorid	26,2

*in CHCl₃

Da sich DMAC im Falle der anionischen Copolymere als Lösemittel für die SEC bewährt hat, sollte es auch für die kationischen Proben getestet werden. Ein großer Vorteil liegt darin, dass in DMAC auch kommerzielle PMMA-Standards zur Kalibrierung eingesetzt werden können. Als stationäre Phase dient die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Säulenkombination GRAM 3000 Å und GRAM 100 Å.

Erste Messungen in reinem DMAC ohne Salzzusatz sind in Abb. 3.24 gezeigt. Probe E100 eluiert in einem gleichmäßigen Peak bei etwa 16 ml und weist bei niedrigen Elutionsvolumina (etwa 10,5 ml) noch einen kleinen zweiten Peak auf. Für RL100 und RS100 kann lediglich eine starke Deformierung der Basislinie beobachtet werden, aus der nicht ersichtlich ist, ob die Proben überhaupt eluieren. Die gezeigten Darstellungen sind aus den Rohdaten erstellt, da eine Basislinienkorrektur, die normalerweise bei Elugrammen üblich ist, für Abb. 3.24 b und c nicht durchgeführt werden kann. Aus diesen Beobachtungen wird deutlich, wie stark sich der Einfluss

von quartären (Probe RL100 und RS100) gegenüber tertiären (Probe E100) Aminogruppen in der SEC auswirkt.

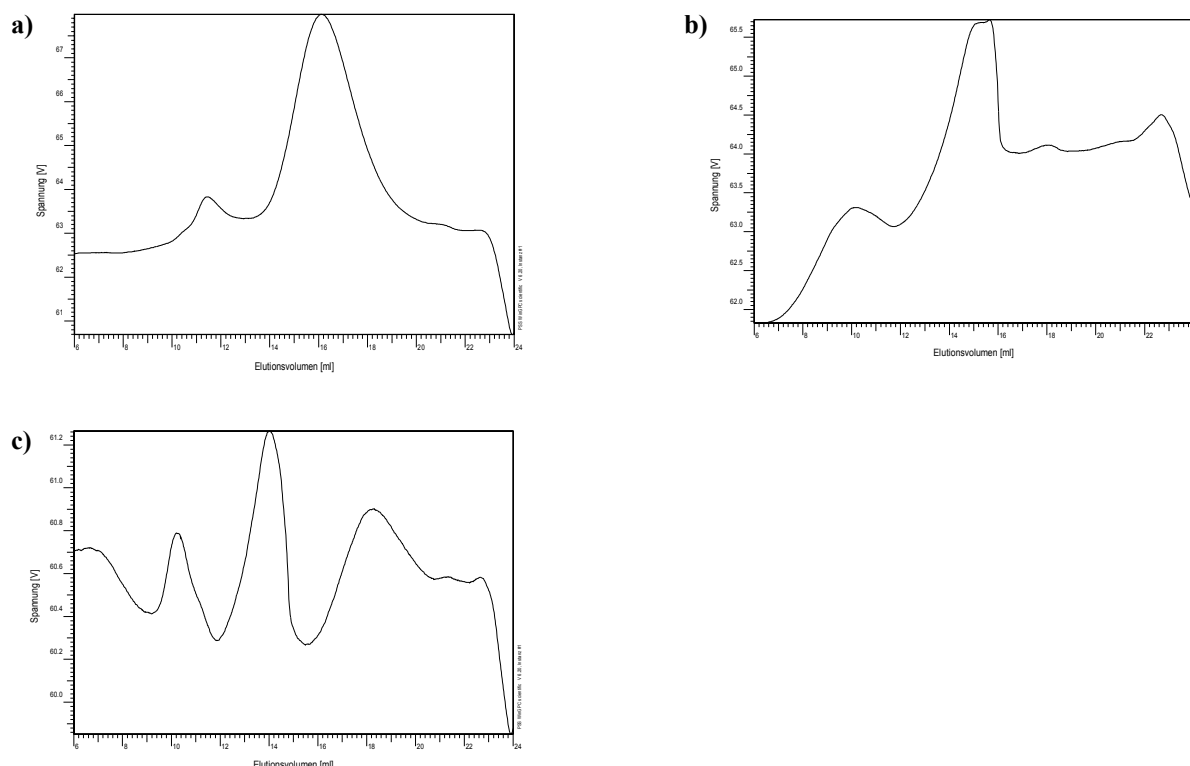


Abb. 3.24: Elugramme der Proben E100 (a), RL100 (b) und RS100 c) in reinem DMAC bei 60 °C, stationäre Phase: GRAM 3000 Å + GRAM 100 Å

Analog zur Vorgehensweise bei den anionischen Proben, wurde nun ebenfalls die in DIN 55672-2^[92] vorgeschlagene Eluentenzusammensetzung getestet. Die Elugramme in Abb. 3.25 zeigen, dass durch den Salzzusatz für alle drei Proben gleichmäßige und unimodale Elutionsprofile erhalten werden. Zudem wurden von den modifizierten Proben jeweils die mit der geringsten und mit der höchsten Viskositätszahl (EB und ED bzw. RLF und RLG) gemessen. In den Elugrammen wird deutlich, dass die Elutionsreihenfolge nach sinkenden Viskositäten – und somit auch nach sinkenden Molmassen - erfolgt und dies mit einem Größenausschlussmodus übereinstimmt. Ferner wird beobachtet, dass für die Elugramme in Abb. 3.25 a) (E100 und Modifikationen) in Doppelinjektionen gut reproduzierbare Elugramme erhalten werden. Die Reproduzierbarkeit der Elugramme von RL100 und RS100 ist weniger gut als die von E100. Die Peakmaxima stimmen überein, jedoch variieren die Peakbreiten und die Basislinie zeigt Schwankungen, die eine Auswertung der Elugramme erschweren.

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Zugabe eines Amins zum Eluenten das Elutionsverhalten der kationischen Proben verbessern kann. Diese Modifikation des Eluenten

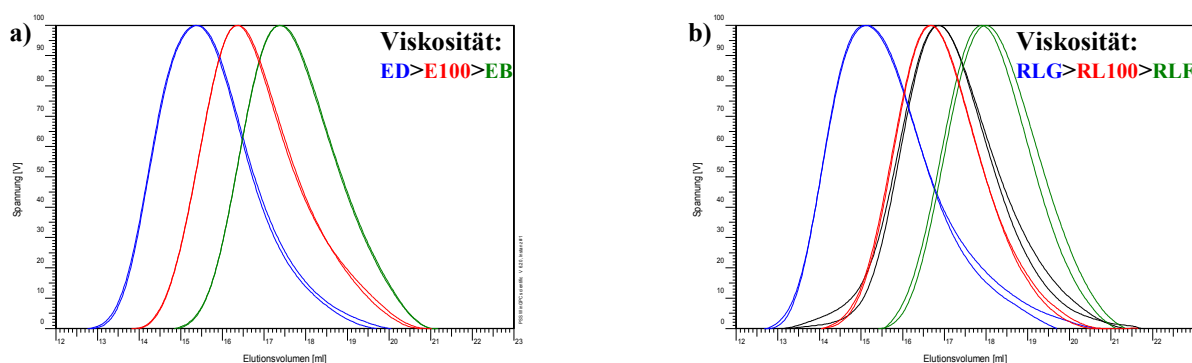


Abb. 3.25: a) Überlagerung der SEC-Elugramme von E100 (rot), EB (grün) und ED (blau)
 b) Überlagerung der SEC-Elugramme von RL100 (rot), RLF (grün), RLG (blau) und RS100 (schwarz); Eluent in beiden Fällen: DMAC + 5 g/l LiBr, stationäre Phase: GRAM 3000 Å + GRAM 100 Å

könnte eventuelle enthalpische Wechselwirkungen von quartären Aminogruppen der Probenmoleküle mit der stationären Phase unterdrücken. Dafür wurde dem DMAC Tris-(hydroxymethylamino)-methan (TRIS) in einer Konzentration von 1 g/l zugesetzt und die Konzentration des LiBr auf 3 g/l reduziert. Für alle Copolymere wurde eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Elution und teilweise eine schmalere Peakform festgestellt. Die entsprechenden Überlagerungen der Elugramme (jeweils Doppelinjektionen) sind in Abb. 3.26 gezeigt. Erneut kann bestätigt werden, dass die Elution der modifizierten Proben, wie in der SEC zu erwarten, nach absteigender Viskosität ($ED > EC > E100 \approx EA > EB$) erfolgt. Dies stimmt auch mit dem Polymerisationsansatz überein. Die angestrebten Molmassen sollten $4/2$, $3/2$, $2/2$ und $1/2$ der Molmasse von E100 betragen. Die gleiche Abstufung gilt auch für die Modifikationen von RL100, deren Elugramme in Abb. 3.26 b) überlagert wurden. Diese Überlagerung zeigt zusätzlich, dass durch den Zusatz von TRIS zum Eluenten auch für die Proben mit quartären Aminogruppen eine gute Reproduzierbarkeit der Elugramme in Doppelinjektionen erreicht wird.

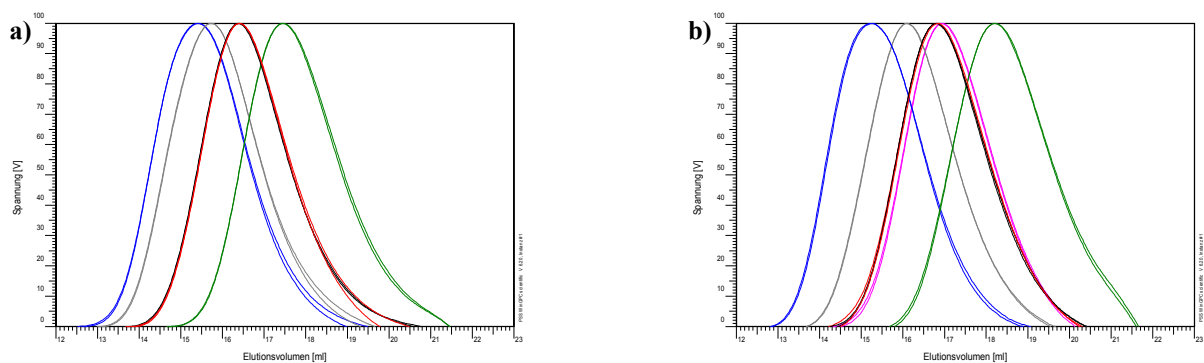


Abb. 3.26: a) Überlagerung der SEC-Elugramme (Doppelinjektionen) von E 100 (rot), EA (schwarz), EB (grün), EC (grau) und ED (blau)
 b) Überlagerung der SEC-Elugramme (Doppelinjektionen) von RL 100 (rot), RLE (schwarz), RLF (grün), RLG (blau), RLH (grau) und RS 100 (pink)
 Eluent in beiden Fällen: DMAC + 3 g/l LiBr + 1 g/l TRIS; stationäre Phase: GRAM 3000 Å + GRAM 100 Å

Da die Zugabe von TRIS eine Verbesserung des Elutionsverhaltens bewirkt hat, sollte zur Optimierung der Methode überprüft werden, ob die Menge an LiBr im Eluenten reduziert werden kann. Da LiBr auf Metalle korrosiv wirkt, wäre es zum Schutz der SEC-Anlage wünschenswert, seinen Anteil gering zu halten. Aus diesem Grund wurden deshalb Eluenten aus DMAC mit TRIS und einer reduzierten Menge LiBr bzw. ohne LiBr getestet. Die Reduktion um eine Komponente hätte zusätzlich den Vorteil, dass durch die Vereinfachung des Systems auch Fehlerquellen verringert würden. Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert, die ohne LiBr mit 2 g/l bzw. 4 g/l TRIS und mit 2 g/l LiBr und 2 g/l TRIS erzielt wurden.

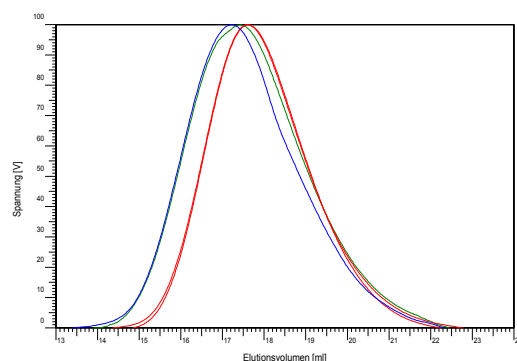


Abb. 3.27: Überlagerung der Elugramme von Probe E100 bei unterschiedlichen Eluentzusammensetzungen: 2 g/l LiBr + 2 g/l TRIS (rot), 2 g/l TRIS (grün), 4 g/l TRIS (blau); stationäre Phase: Vorsäule GRAM + GRAM 3000 Å + GRAM 100 Å

In Abb. 3.27 ist zu sehen, dass bei Probe E100 ohne LiBr eine Verschiebung des Peakmaximums zu niedrigeren Elutionsvolumina und eine Verbreiterung des Peaks auftritt. Durch Erhöhen des TRIS-

Anteils wird der Peak schmäler, er bleibt jedoch zu niedrigeren Elutionsvolumina hin verschoben. Das Elutionsverhalten bei 2 g/l LiBr und 2 g/l TRIS entspricht dem aus Abb. 3.26.

Die Unterschiede der Elutionsvolumina aus Abb. 3.26 und Abb. 3.27 liegen allein darin begründet, dass im letzteren Fall zum Schutz vor Verunreinigungen den SEC-Säulen eine Vorsäule vorgeschaltet wurde. Im Vergleich zu Probe E100 wirkt sich der Zusatz von LiBr zum Eluenten bei RL100 und RS100 wesentlich deutlicher aus, dies ist in Abb. 3.28 dargestellt.

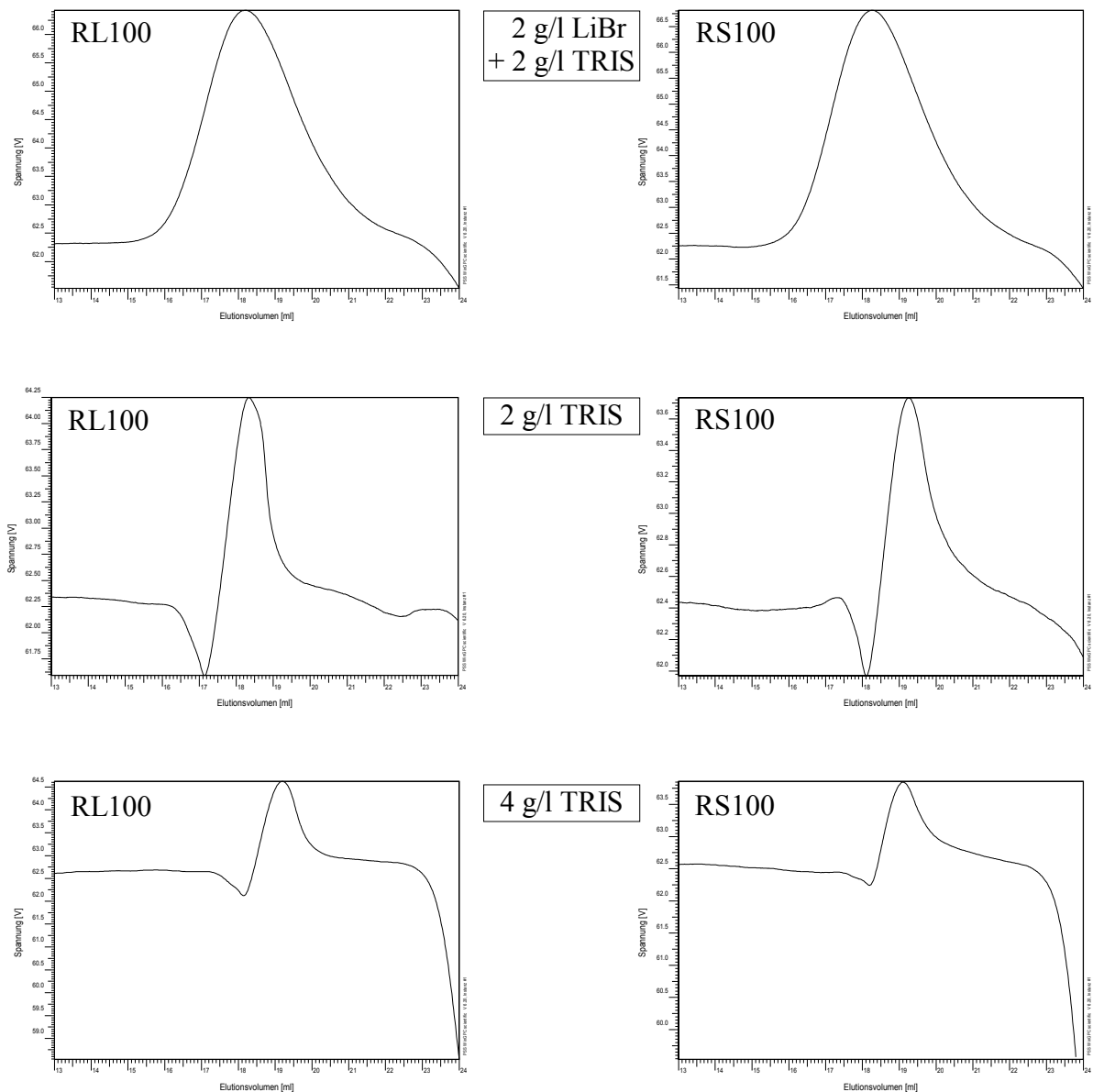


Abb. 3.28: Vergleich der Elugramme von RL100 und RS100 bei verschiedenen Eluentzusammensetzungen; Bedingungen wie in Abb. 3.27

Während bei einer Eluentenzusammensetzung von DMAC + 2 g/l LiBr + 2 g/l TRIS ein symmetrischer Elutionspeak beobachtet wird, erfolgt die Elution bei DMAC + TRIS (ohne LiBr) in einem deformierten Peak. Um das negative Signal bei 17 bis 18 ml darstellen zu können, wurde wie in Abb. 3.24 (Messungen in reinem DMAC) eine Auftragung der Rohdaten ohne Basislinienkorrektur gewählt. Das negative Signal ist weder einem Salz- noch einem Lösemittelpeak zuzuordnen, die bei einem Elutionsvolumen ab etwa 24 ml auftreten. Die niedrige und teilweise negative Signalintensität kann in Wechselwirkungen mit der stationären Phase sowie in einer geringen Brechungsindexdifferenz zwischen DMAC und den kationischen Polymerproben begründet werden. Durch den Zusatz von LiBr wird der Brechungsindex des Eluenten herabgesetzt, so dass intensivere und im ganzen Elutionsbereich positive Signale resultieren. Ferner ermöglicht das LiBr die Unterdrückung der Ladungseffekte, welche durch die quartären Ammoniumgruppen hervorgerufen werden und durch das nichtionische TRIS nicht kompensiert werden können. Anhand der Elugramme kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie die Wichtung der diskutierten Einflüsse gesetzt werden müsste.

Während somit für RL100 und RS100 sowohl bei einer Konzentration von 2 als auch von 4 g/l TRIS keine zufriedenstellenden Elugramme erhalten werden konnten, entspricht die Elutionsform bei einer Eluentenzusammensetzung von DMAC + 2 g/l LiBr + 2 g/l TRIS der, die auch mit einer Salzkonzentration von 3 g/l LiBr und 1 g/l TRIS (Abb. 3.26b) erhalten wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Zusatz von LiBr zum Eluenten notwendig ist, die Konzentration jedoch bei gleichbleibenden Resultaten auf 2 g/l reduziert werden kann.

Die Robustheit der Methode wurde in wiederholten Tests über einen Zeitraum von mehreren Monaten getestet. Für die Entwicklung dieser Methode wurde der gleiche Säulensatz eingesetzt, auf dem auch anionische Proben in einem sauren Eluenten untersucht wurden. Im Testzeitraum war es erforderlich, einen Eluentenwechsel von basisch (DMAC + LiBr + TRIS) auf sauer (DMAC + LiBr + AcOH) und wieder zurück auf den basischen Eluenten durchzuführen. Da sich die Poren und die Oberfläche des Gelmaterials von SEC-Säulen durch einen Eluentenwechsel leicht verändern können, sind in der Regel lange Spülprozeduren notwendig, um den Ausgangszustand wiederherzustellen. Abb. 3.29 zeigt die Elugramme der kationischen Proben, die unmittelbar nach einem solchen Eluentenwechsel (von sauer nach basisch) aufgenommen wurden. In der Überlagerung (jeweils Doppelinjektionen) wird deutlich, dass für alle Proben gleichmäßige und reproduzierbare Elutionsprofile gewährleistet sind.

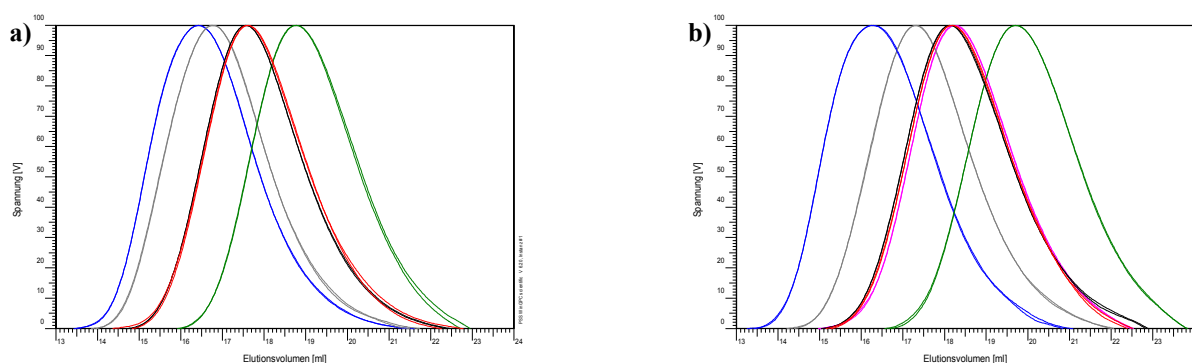


Abb. 3.29: a) Überlagerung der SEC-Elugramme von E100 (rot), EA (schwarz), EB (grün), EC (grau) und ED (blau); b) Überlagerung der SEC-Elugramme von RL100 (rot), RLE (schwarz), RLF (grün), RLG (blau), RLH (grau) und RS100 (pink); Eluent in beiden Fällen: DMAC + 2 g/l LiBr + 2 g/l TRIS; stationäre Phase: Vorsäule GRAM + GRAM 3000 Å + GRAM 100 Å

Ein direkter Vergleich der Messungen vor und nach dem Eluentenwechsel wird anhand einer Überlagerung der Molmassenverteilungen in Abb. 3.30 dargestellt.

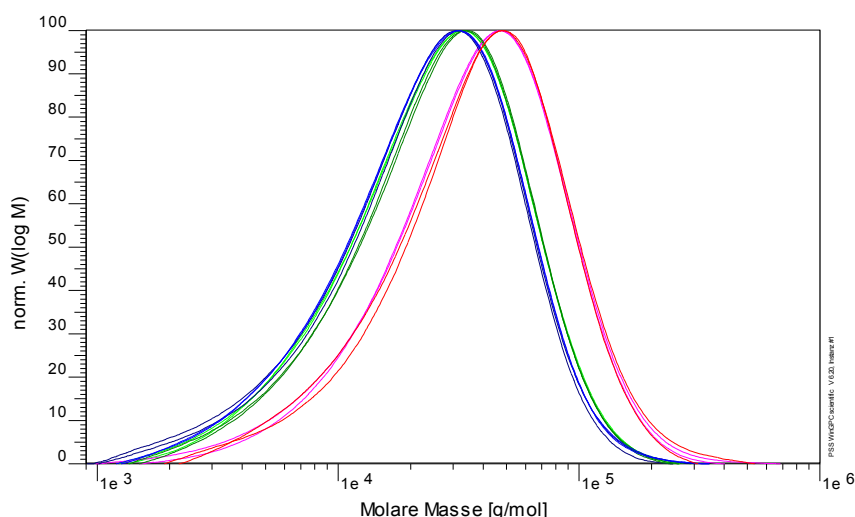


Abb. 3.30: Überlagerung der Molmassenverteilungen (jeweils Doppelinjektionen) von E100 (rot und rosa), RL100 (grün und hellgrün) und RS100 (blau und hellblau), welche im Abstand von 4 Monaten und nach Eluentenwechsel (basisch, sauer, basisch) aufgenommen wurden; Bedingungen wie in Abb. 3.29

Die korrespondierenden M_w -Werte in Abb. 3.31 zeigen einen Unterschied von maximal 5% für die Messung vor bzw. nach dem Eluentenwechsel. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Methode sehr robust ist und gleichbleibende Ergebnisse liefert. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die ermittelten Werte keine wahren Molmassen, sondern lediglich PMMA-Molmassenequivalente sind. Eine Verifizierung der durch PMMA-Kalibration erhaltenen Werte mithilfe der Lichtstreuung ist – anders als im Falle der anionischen Copolymere – nicht möglich, da die Lichtstreuungssignale im verwendeten Eluenten zu schwach sind, um eine zufriedenstellende Auswertung durchführen zu können. In Abb. 3.32 soll dies durch einen Vergleich von 3D-Plots einer PMMA-Formmasse

Probe	M _w vor Umst.	M _w nach Umst.
E100	52.000	50.000
EA	51.000	51.000
EB	23.000	22.000
EC	100.000	97.000
ED	131.000	128.000
RL100	35.000	34.000
RLE	34.000	34.000
RLF	12.000	12.000
RLG	136.000	141.000
RLH	62.000	64.000
RS100	32.000	33.000

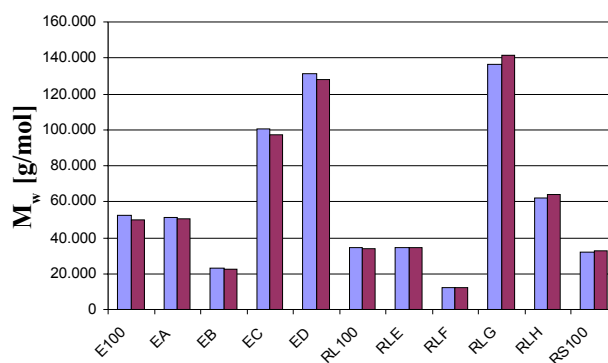


Abb. 3.31: Reproduzierbarkeit der M_w-Werte (aus einer PMMA-Kalibration) im Abstand von 4 Monaten und nach Eluentenwechsel (basisch, sauer, basisch), vor Umstellung: blau, danach: rot; Bedingungen wie in Abb. 3.29

gezeigt werden, die durch die SEC-Lichtstreuungskopplung im basischen und sauren DMAC-Eluenten erhalten wurden. Dabei wird die Streuintensität der verschiedenen Winkel in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen aufgetragen. Während im Eluenten mit LiBr und AcOH der Elutionspeak der Probe für alle dargestellten Winkel gut zu sehen ist, ist dies für die Signale im Eluenten mit LiBr und TRIS nicht der Fall.

Die über die entwickelte DMAC-Methode erhaltenen M_w-Werte liegen bei 50.000 g/mol für EUDRAGIT® E 100, 34.000 g/mol für EUDRAGIT® RL 100 und 32.000 g/mol für EUDRAGIT® RS 100. Für die Probe E100 haben wir keine weiteren Vergleichsmöglichkeiten. Für die Proben

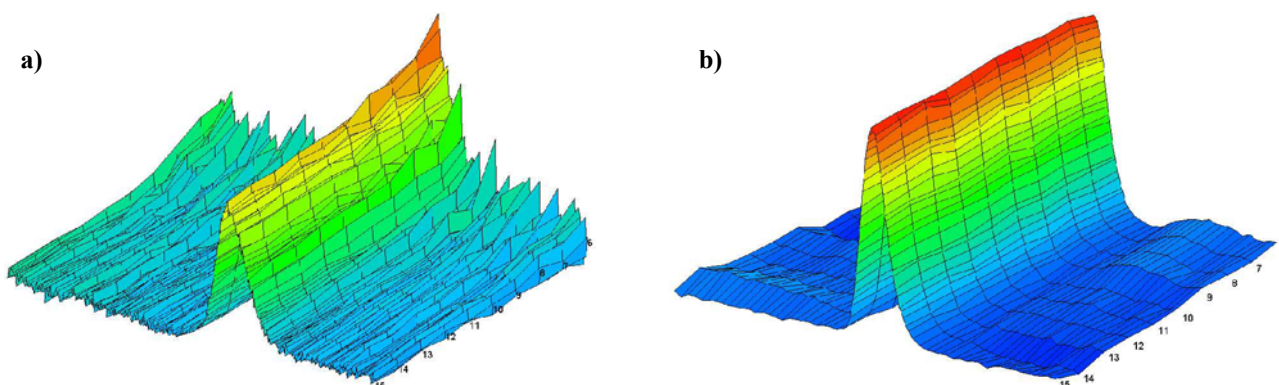


Abb. 3.32: 3D-Plot (Streuintensität der einzelnen Winkel in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen) einer PMMA-Formmasse aus der SEC-Lichtstreuungskopplung in DMAC + 2 g/l LiBr + 2 g/l TRIS (a) und in DMAC + 3 g/l LiBr + 100 mM AcOH (b)

RL100 und RS100 kann ein Vergleich mit Literaturdaten vorgenommen werden. Wittgren et. al.^[9] geben an, durch die online-Lichtstreuungskopplung einer SEC in Ethanol mit LiCl M_w-Werte von 32.000 g/mol für Probe RL100 und 39.000 g/mol für Probe RS100 erhalten zu haben. Vergleicht man allerdings die ebenfalls im Artikel abgebildeten Molmassenverteilungen, dann erscheint RS kleiner als RL und bestätigt somit die am DKI erhaltenen Ergebnisse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für kationische Methacrylat-Copolymere eine SEC-Methode entwickelt werden konnte, in welcher die gleiche Säulenkombination wie in der beschriebenen Methode für anionische Copolymere verwendet wird. Die Optimierung der Elutionsbedingungen erfolgte durch die Abstimmung der LiBr- und TRIS-Konzentrationen im Eluenten. Die Wahl von DMAC als Eluent zeigt zwei Vorteile. Zum einen kann ein Eluentenwechsel für die Analyse von anionischen und kationischen Copolymeren schnell erfolgen und zum anderen kann die Kalibration der SEC mit PMMA-Standards in jedem Labor durchgeführt werden, während dies in stärker polaren Lösemitteln wie Wasser oder Ethanol nicht möglich ist.

4 Entwicklung von gekoppelten chromatographischen Methoden für hydrophile Copolymere

Im Gegensatz zu unpolaren Polymeren gibt es keine chromatographischen Methoden, die eine umfassende Charakterisierung von hydrophilen Copolymeren ermöglichen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, zunächst geeignete chromatographische Methoden für die Bestimmung der Molmassenverteilung und der chemischen Heterogenität (Zusammensetzung) für verschiedene hydrophile synthetische Copolymersysteme zu entwickeln. Aus der Summe der Einzelinformationen dieser Methoden ist es jedoch nicht möglich, Rückschlüsse darauf zu ziehen, wie die Eigenschaften der einzelnen Komponenten dieser komplexen Systeme miteinander korreliert sind. Aus diesem Grund sollten in einem zweiten Schritt erstmals auch mehrdimensionale Methoden auf hydrophile Copolymersysteme angewendet werden.

Für die Entwicklung der chromatographischen Verfahren wurden Modellpolymere unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung eingesetzt. Es handelt sich in allen Fällen um segmentierte Copolymere, die Polyethylenglykol als einen gemeinsamen hydrophilen nichtionischen Bestandteil aufweisen. Diese Copolymere können weiter eingeteilt werden in Systeme mit einem ionischen, einem nichtionisch hydrophilen und einem unpolaren Copolymerisationspartner.

Bei den ionischen Copolymeren wurden Pfropfcopolymere untersucht, die Polyethylenglykol (PEG) als Rückgrat mit Seitenketten aus Polymethacrylsäure (PMAS) aufweisen (PEG-g-PMAS) bzw. solche, in denen PMAS das Rückgrat und PEG die Seitenketten darstellen (PMAS-g-PEG). Bei den hydrophil-hydrophoben Copolymeren handelt es sich um mit Vinylacetat (VAc) gepfropfte Polyethylenglykole (PEG-g-PVAc), aus denen durch Hydrolyse Vinylalkohol-Copolymere (PEG-g-PVOH) erhalten werden.

4.1 Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung von verzweigten Copolymeren aus PEG und PMAS

Die Pfropfcopolymere aus PEG und PMAS wurden mit unterschiedlichen Synthesestrategien hergestellt. Eine Serie von PEG-g-PMAS-Pfropfcopolymeren entstand durch die radikalische Pfropfung von MAS auf PEGs unterschiedlicher Molmassen (zwischen 600 und 6000 g/mol) und in variablen PEG/MAS-Anteilen. Die PMAS-g-PEG-Pfropfcopolymere wurden erhalten, indem zunächst aus einem Monomethoxy-PEG (MPEG) und MAS ein Makromonomeres (MPEG-MM) synthetisiert wird. Anschließend wird eine Homopolymerisation zu P(MPEG-MM) oder eine

Copolymerisation mit MAS zu P(MPEG-MM-co-MAS) durchgeführt. Dementsprechend handelt es sich hier strenggenommen um Kammcopolymere. Zur Vereinfachung werden diese Copolymere als Pfropfcopolymere der Struktur PMAS-g-PEG betrachtet. Wie komplex die Copolymere aufgebaut sein können, wird aus den Strukturformeln in Abb. 4.1 und den darin enthaltenen Indizes für die strukturellen Einheiten deutlich.

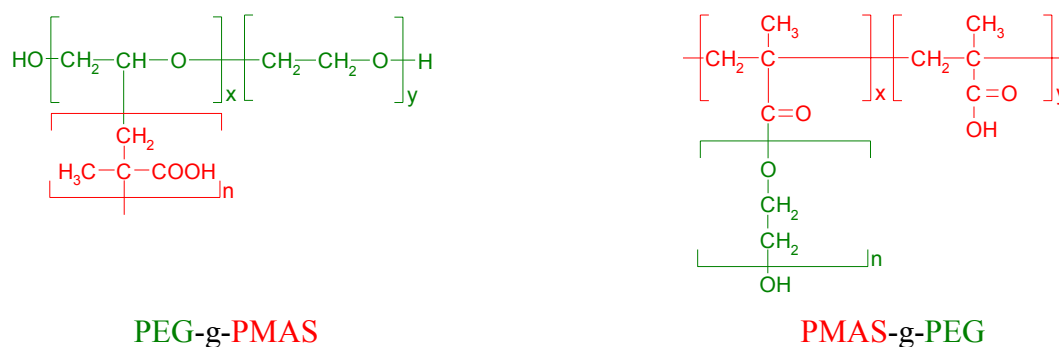


Abb. 4.1: Chemische Struktur der Pfropfcopolymere PEG-g-PMAS und PMAS-g-PEG

Für das Rückgrat kann eine Häufigkeits- und Sequenzverteilung für x und y vorliegen, während dem Strukturbaustein mit dem Index x zusätzlich noch eine Verteilung der Seitenkettenlänge n überlagert ist. Da Copolymerisationen oft nicht vollständig verlaufen, können im Reaktionsprodukt auch unumgesetzte Edukte oder aber als Nebenprodukt gebildete Homopolymere vorhanden sein. Dies sei für beide Copolymertypen PEG-g-PMAS und PMAS-g-PEG in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

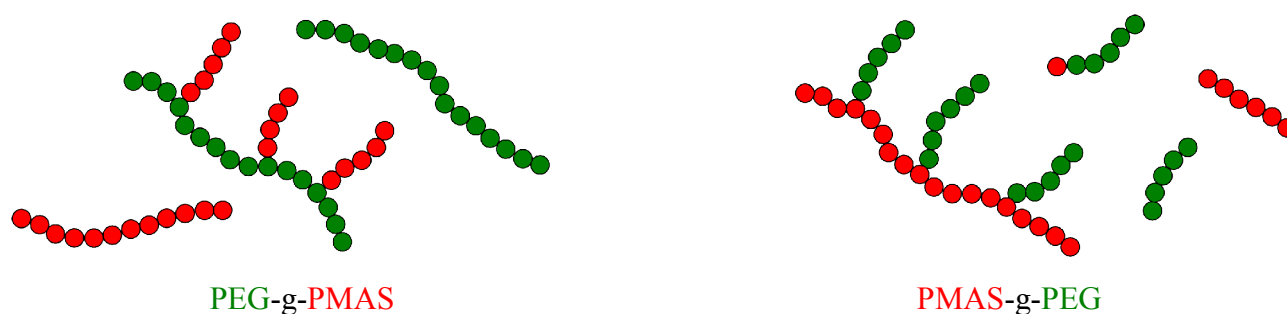


Abb. 4.2: Zusammensetzung des Produktgemisches von PEG-g-PMAS und PMAS-g-PEG

Eine Übersicht über die Serien der Modellpolymere PEG-g-PMAS und PMAS-g-PEG ist in Tab. 4.1 und Tab. 4.2 gegeben.

Tab. 4.1: Pffropfcopolymere PMAS-g-PEG aus der Homopolymerisation von MPEG-MM bzw. aus der Copolymerisation des Makromonomers mit MAS (mit Eduktzusammensetzungen)

Gew.-% MAS	Mol.% MAS	Bezeichnung
0	0	PMAS-0-MPEG-MM
10	58	PMAS-10-MPEG-MM
20	72	PMAS-20-MPEG-MM
30	84	PMAS-30-MPEG-MM

Tab. 4.2: Pffropfcopolymere PEG-g-PMAS aus variablen Eduktzusammensetzungen

Gew.-% PEG/MAS	Mol.-% EG/MAS	PEG 1500	Mol.-% PEG 1,5k	PEG 4000	Mol.-% PEG 4k	PEG 6000	Mol.-% PEG 6k
85/15	92/8	PEG-1,5k85-PMAS	25	PEG-4k85-PMAS	11	PEG-6k85-PMAS	8
80/20	89/11	PEG-1,5k80-PMAS	19	PEG-4k80-PMAS	8	PEG-6k80-PMAS	5
75/25	85/15	PEG-1,5k75-PMAS	15	PEG-4k75-PMAS	6	PEG-6k75-PMAS	4
70/30	82/18	PEG-1,5k70-PMAS	12	PEG-4k70-PMAS	5	PEG-6k70-PMAS	3

4.1.1 Wässrige Größenausschlusschromatographie

4.1.1.1 PMAS-g-PEG-Copolymere

Um erste Informationen über die Molmasse der Pffropfcopolymere zu erhalten, wurden sie mithilfe der wässrigen Größenausschlusschromatographie untersucht. Als stationäre Phase wurde ein polares Säulenmaterial gewählt, das sich speziell für die Analytik von neutralen und anionischen wasserlöslichen Polymeren eignet. Für die Messungen wurde eine Linearsäule aus diesem als SUPREMA erhältlichen polaren Material eingesetzt. Linear bezeichnet in diesem Fall die Porengrößenverteilung der stationären Phase und bedeutet, dass nicht nur eine Porosität für einen engen Molmassenbereich vorliegt, sondern eine Mischung verschiedener Porositäten, die eine Linearität der Trennung über einen großen Bereich gewährleistet. Als mobile Phase wurde entsprechend einer bei der BASF AG implementierten Methode eine wässrige Lösung folgender Zusammensetzung gewählt: TRIS (Tris-(hydroxymethylamino)-methan) 0,08 M, NaCl 0,15 M, NaN₃ 0,01 M, pH 7. Die Detektion erfolgte über einen RI-Detektor. Die erhaltenen Elugramme sind in Abb. 4.3 dargestellt. Das Elugramm in Abb. 4.3a zeigt, dass das Homopolymere PMAS-0-MPEG-MM eine Oligomerverteilung aufweist. Der Peak bei 12,4 ml wird durch das im Eluenten enthaltene Salz hervorgerufen. Im gleichen Bereich eluieren auch das Makromonomer und das Edukt MPEG. Diese können demnach mit der vorliegenden Methode nicht nachgewiesen werden.

Der Peak bei 11,8 ml kann dem Dimer, und die Schulter bei 11,1 ml dem Tri- bis Hexamer zugeordnet werden (durch Vergleich mit PEGs entsprechender Molmassen). Durch eine Kalibration mit PEG-Standards wird für das Homopolymer ein M_w von 45.000 g/mol bestimmt.

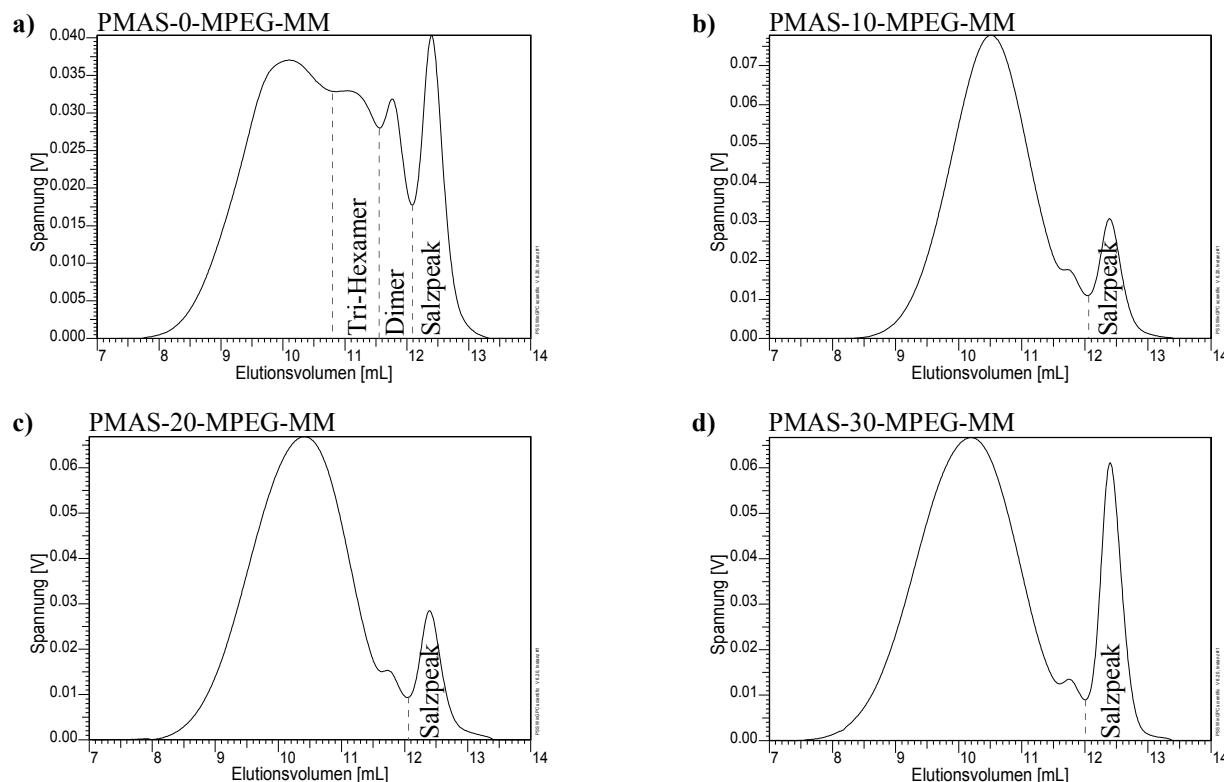


Abb. 4.3: SEC-Elugramme der PMAS-g-PEG-Copolymere; chromatographische Bedingungen: stationäre Phase: Suprema linear M (300 x 8 mm i.d.), mobile Phase: Wasser + 0,08 M TRIS + 0,15 M NaCl + 0,01 M NaN_3 , pH 7; Flussrate: 1 ml/min, Detektor: RI

Die Copolymere eluieren in einem breiten Produktpeak, der eine Schulter im Bereich des Dimers aufweist. Ein Vergleich der drei Elugramme zeigt, dass mit zunehmendem MAS-Gehalt ein Anstieg der Molmassen erfolgt. Die über PEG-Kalibration erhaltenen M_w -Werte sind 21.000 g/mol (für PMAS-10-MPEG-MM), 37.000 g/mol (für PMAS-20-MPEG-MM) und 64.000 g/mol (für PMAS-30-MPEG-MM).

4.1.1.2 PEG-g-PMAS-Copolymere

Abb. 4.4 und Abb. 4.5 zeigen die SEC-Elugramme der PEG-g-PMAS-Serie. In allen Fällen werden multimodale Elutionsprofile erhalten. Zunächst fällt auf, dass in allen Fällen nicht umgesetztes PEG im Produktgemisch enthalten ist. Der Produktpeak zwischen 7 und 11 ml nimmt mit abnehmendem PEG-Anteil an Intensität zu. Dabei tritt auch eine Verschiebung des Produktpeaks zu niedrigen Elutionsvolumina auf. Dies zeigt, dass zunehmend höhermolekulare Produkte gebildet werden.

Das Elutionsvolumen des jeweils eingesetzten PEGs ist in jedem Elugramm markiert, so dass leicht gezeigt werden kann, dass der intensivste Peak immer dem unumgesetzten PEG zugeordnet werden kann.

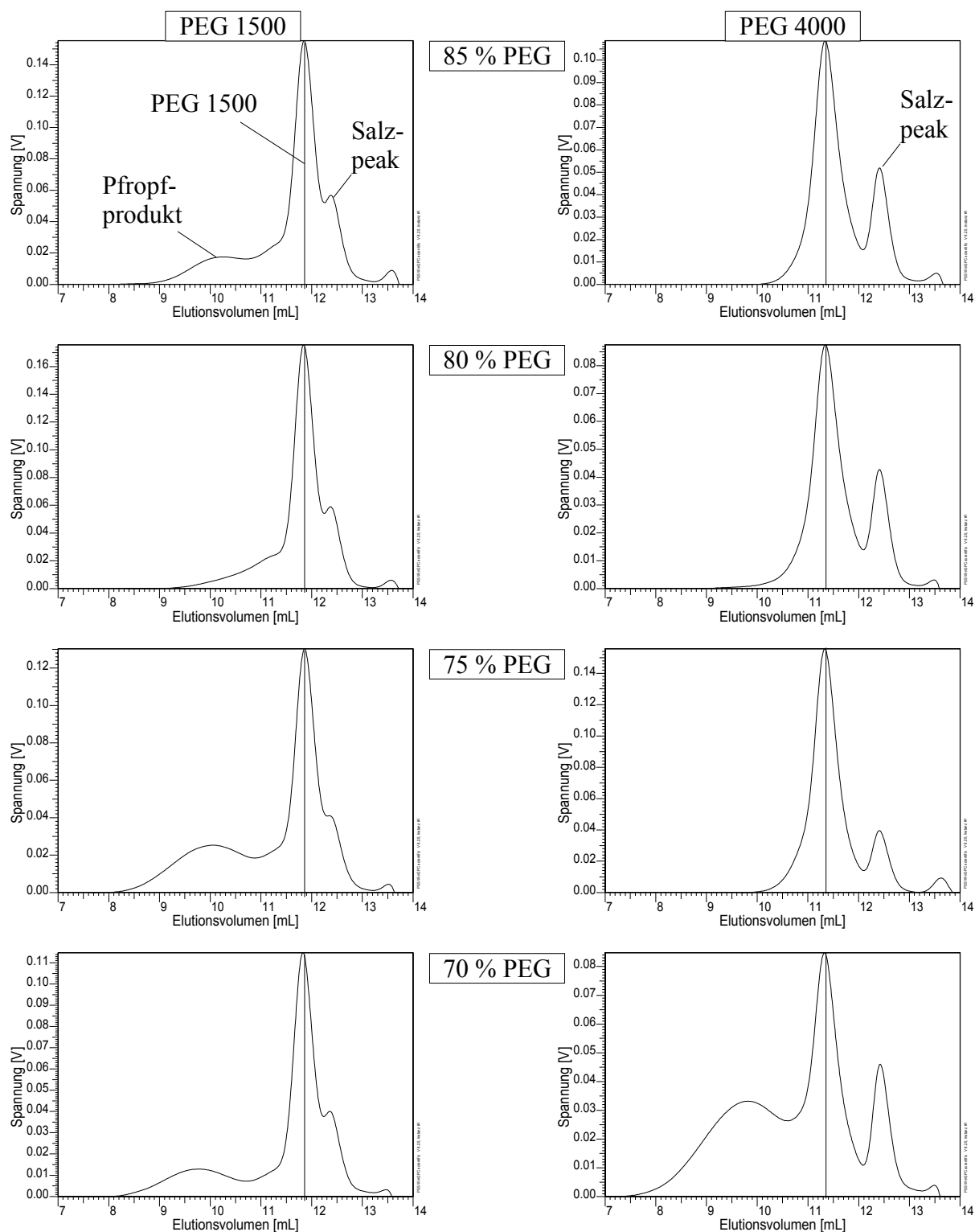


Abb. 4.4: SEC-Elugramme von PEG-g-PMAS aus der Propfung von PEG 1500 und PEG 4000; chromatographische Bedingungen siehe Abb. 4.3

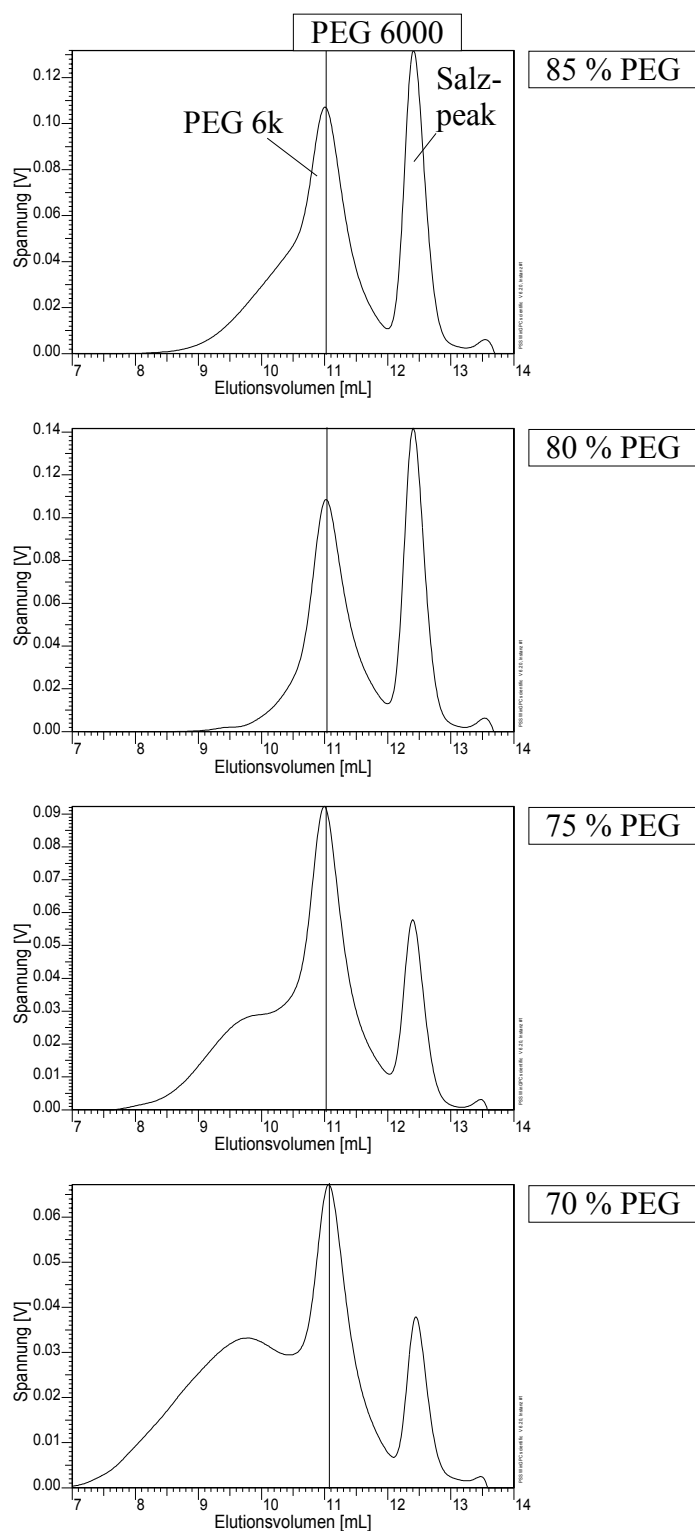


Abb. 4.5: SEC-Elugramme von PEG-g-PMAS aus der Pfropfung von PEG 6000; chromatographische Bedingungen siehe Abb. 4.3

Die Pfropfprodukte eluieren als mehr oder weniger stark ausgeprägte Schultern vor dem PEG, so dass eine getrennte Betrachtung und Molmassenauswertung der Produkte unabhängig vom Edukt

nicht möglich ist. Bei der Pfropfung von PEG 4000 werden für die Proben mit hohem PEG-Gehalt keine höhermolekularen Produkte beobachtet. Nur PEG-4k70-PMAS, die Probe mit der geringsten PEG-Konzentration, zeigt einen deutlichen Produktpeak. Weitere Abweichungen treten bei PEG-1,5k80-PMAS und PEG-6k80-PMAS auf, dort ist der Produktpeak weniger stark ausgeprägt als in den anderen Proben der jeweiligen Serie.

Mithilfe der wässrigen SEC konnte bereits eine erste Abschätzung darüber getroffen werden, ob und in welchem Maße bei der Copolymerisation von MPEG-MM mit MAS und bei der Pfropfreaktion von PEG mit MAS hochmolekulare Produkte entstehen. Für die PMAS-g-PEG-Copolymere konnte gezeigt werden, dass mit steigendem MAS-Anteil eine Zunahme der Molmasse erfolgt. Dieser Trend konnte auch bei den PEG-g-PMAS-Copolymeren beobachtet werden. Es ist jedoch nicht möglich, mit der wässrigen SEC eine Trennung in einzelne Produkte zu erreichen. Auch die Molmassenverteilung der Produkte kann nicht ermittelt werden, da immer nur eine Angabe der Molmassen für die Gesamtprobe möglich ist. Aus diesem Grund ist die wässrige SEC als Einzelmethode nicht für die Analyse der vorliegenden Proben geeignet.

4.1.2 Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption von PEG

Da eine SEC-Trennung im vorliegenden Fall nicht zur Auftrennung der Produkte führt, wurde die Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption von PEG (LC-CC) eingesetzt, um eine Trennung nach der chemischen Zusammensetzung zu erreichen. Um den kritischen Punkt der Adsorption für ein bestimmtes Polymeres zu ermitteln, müssen zunächst geeignete stationäre und mobile Phasen ausgewählt werden. Im vorliegenden Fall sind die Produkte polarer als das Edukt PEG. Auf einer HPLC-Säule mit RP-18-Phase sollten die Produkte somit früher (im SEC-Modus) eluieren als das PEG. Als mobile Phase wurde das Lösemittelgemisch Methanol/Wasser gewählt. Durch Testen verschiedener Zusammensetzungen mit einer Reihe von PEG-Standards wurde das Lösemittelgemisch Methanol/Wasser 81/19 Gew.-% als der Eluent ermittelt, mit dem alle PEG-Standards unabhängig von ihrer Molmasse beim gleichen Elutionsvolumen eluieren.

4.1.2.1 PMAS-g-PEG-Copolymere

Das in den Copolymerisationen eingesetzte MPEG-MM wird durch Umsetzung von MPEG und MAS hergestellt. Schon hier ist davon auszugehen, dass die Reaktion nicht vollständig erfolgt und Vorstufen im Reaktionsprodukt verbleiben. Daher wurden diese Edukte mit der LC-CC untersucht.

Abb. 4.6 a) bis d) zeigt die Elugramme des Ausgangs-PEG 970 und des daraus hergestellten MPEG. Dem gegenübergestellt sind die Elugramme von Makromonomeren MPEG-MM zweier verschiedener Hersteller. Zu einem besseren Vergleich ist in allen Elugrammen das Elutionsvolumen von PEG gekennzeichnet. Entsprechend seiner Polarität eluiert das MPEG (2,5 ml) etwas später als das PEG (2,4 ml). Das Makromonomere MPEG-MM1 ist deutlich heterogen aufgebaut. MPEG-MM2 hingegen zeigt neben dem Produktpeak nur eine kleine Schulter im Bereich des Elutionsvolumens von MPEG.

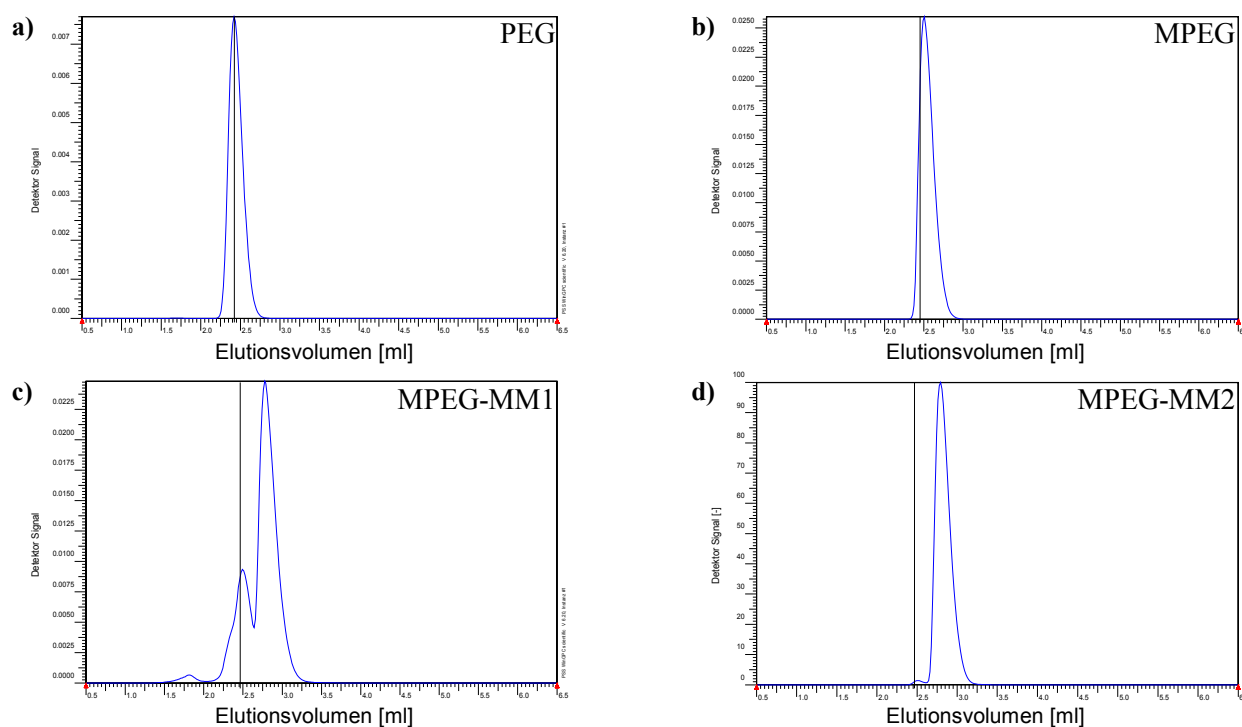


Abb. 4.6: LC-CC-Elugramme von PEG 970 (a), MPEG (Pluriol A1000E) (b) und zwei verschiedenen MPEG-MM (c) und (d); stationäre Phase: Knauer Nucleosil RP18-100, mobile Phase: Methanol/Wasser 81/19 (w/w), Flussrate: 1 ml/min, Detektor: ELSD

Um weitere Informationen über diese Edukte zu erhalten, wurden MALDI-TOF-Massenspektren des MPEG und der Makromonomeren aufgenommen. Diese sind in Abb. 4.7 abgebildet.

Als Matrix wurde in allen Fällen Dithranol verwendet, die Kationisierung erfolgte mit LiCl. Dementsprechend sind die beobachteten Massenpeaks den $[M+Li]^+$ -Molekülkationen zuzuordnen. Das MPEG (×) zeigt eine einheitliche Oligomerverteilung mit einem Maximum bei 1000 bis 1150 Da und steht damit in Einklang mit dem einheitlichen Elutionspeak aus der LC-CC. PEG (♦) und sein Dimethylether DiMPEG (□) sind lediglich in Spuren nachzuweisen.

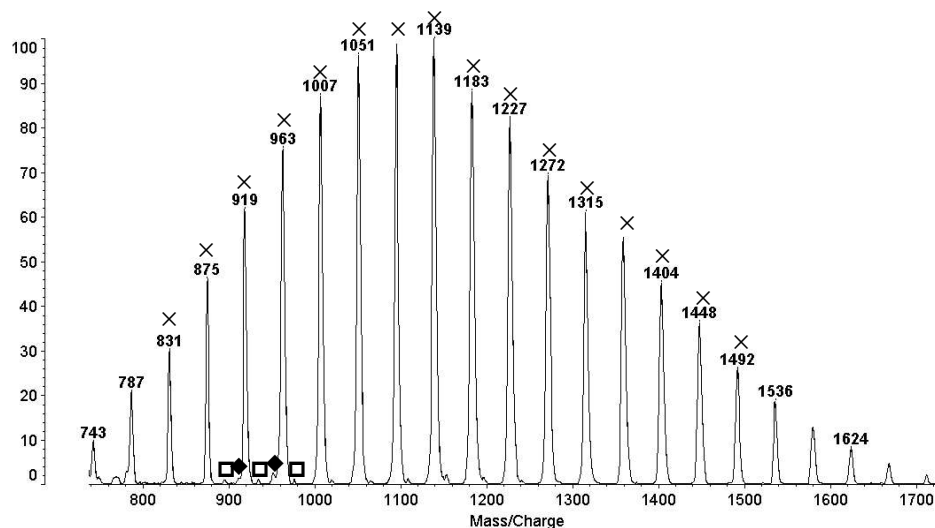
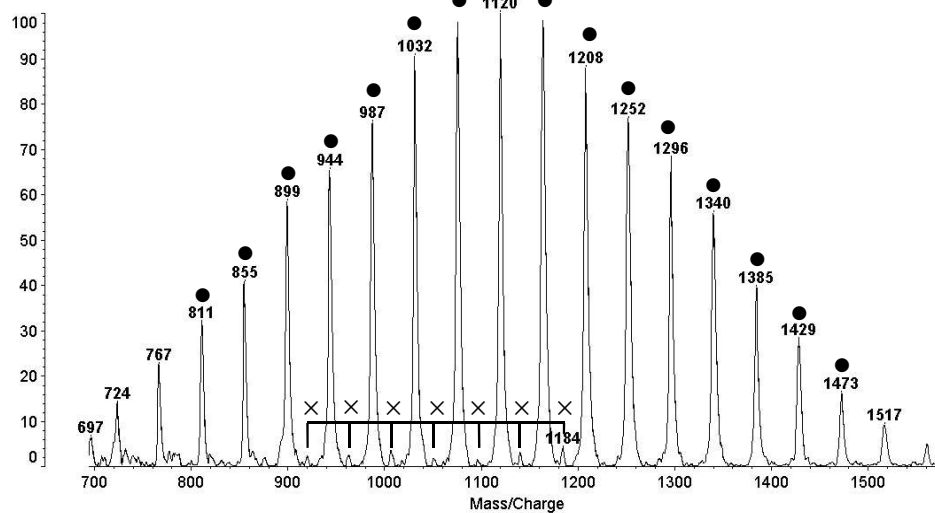
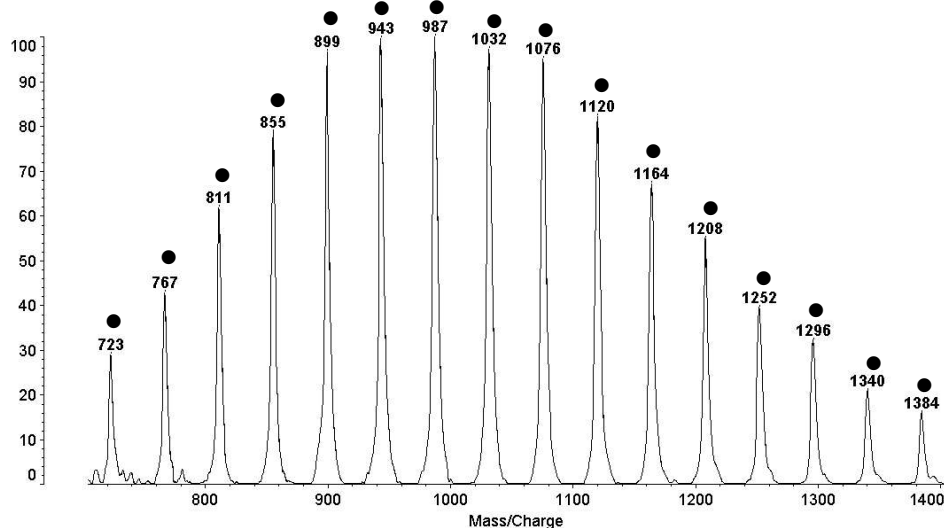
MPEG**MPEG-MM1****MPEG-MM2**

Abb. 4.7: MALDI-TOF-Massenspektren von MPEG und den Makromonomeren MPEG-MM1 und MPEG-MM2

Zuordnung: MPEG (x), MPEG-MM (•), DiMPEG (□) und PEG (♦)

MPEG (×):	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{O-})_n\text{-H}$	$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 39 + 44,05n$
	für $n=22$	$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 1008 \text{ Da (ber.)}$
		$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 1007 \text{ Da (exp.)}$
DiMPEG (□):	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{O-})_n\text{-CH}_3$	$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 53 + 44,05n$
	für $n=20$	$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 934 \text{ Da (ber.)}$
		$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 934 \text{ Da (exp.)}$
PEG (♦):	$\text{HO}-(\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{O-})_n\text{-H}$	$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 25 + 44,05n$
	für $n=21$	$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 950 \text{ Da (ber.)}$
		$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 950 \text{ Da (exp.)}$

Ebenso wie in der Flüssigchromatographie können bei den beiden Makromonomeren deutliche Unterschiede festgestellt werden. Während das MALDI-Spektrum von MPEG-MM2 nur eine Oligomerverteilung aufweist, die dem MPEG-MM (●) zugeordnet werden kann, zeigt das Spektrum von MPEG-MM1 eine zweite Oligomerverteilung geringer Intensität, die rechnerisch dem MPEG entspricht.

MPEG-MM (●):	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{O-})_n\text{-COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$	$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 107 + 44,05n$
	für $n=20$	$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 988 \text{ Da (ber.)}$
		$[\text{M}+\text{Li}]^+ = 987 \text{ Da (exp.)}$

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Beobachtungen aus der LC-CC. Durch Fraktionierung aus der LC-CC und anschließende Untersuchung mit MALDI-TOF (nicht gezeigt) konnte für beide Makromonomere bestätigt werden, dass der Peak bei 2,5 ml dem MPEG entspricht. Aufgrund des geringen Gehaltes von MPEG im MPEG-MM2 konnte dieses ohne vorhergehende Fraktionierung nicht mit MALDI-TOF nachgewiesen werden.

Die PMAS-g-PEG-Copolymere wurden aus MPEG-MM2 hergestellt, welches die geringeren Verunreinigungen aufweist. Durch die Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption für PEG kann nun auch die chemische Heterogenität dieser Copolymere untersucht werden. Die entsprechenden Elugramme sind in Abb. 4.8 wiedergegeben.

In allen vier Elugrammen kann MPEG nachgewiesen werden (bei 2,5 ml). Durch Auswertung der Peakfläche bei 2,5 ml kann der MPEG-Gehalt in den Produktgemischen bestimmt werden. Er liegt

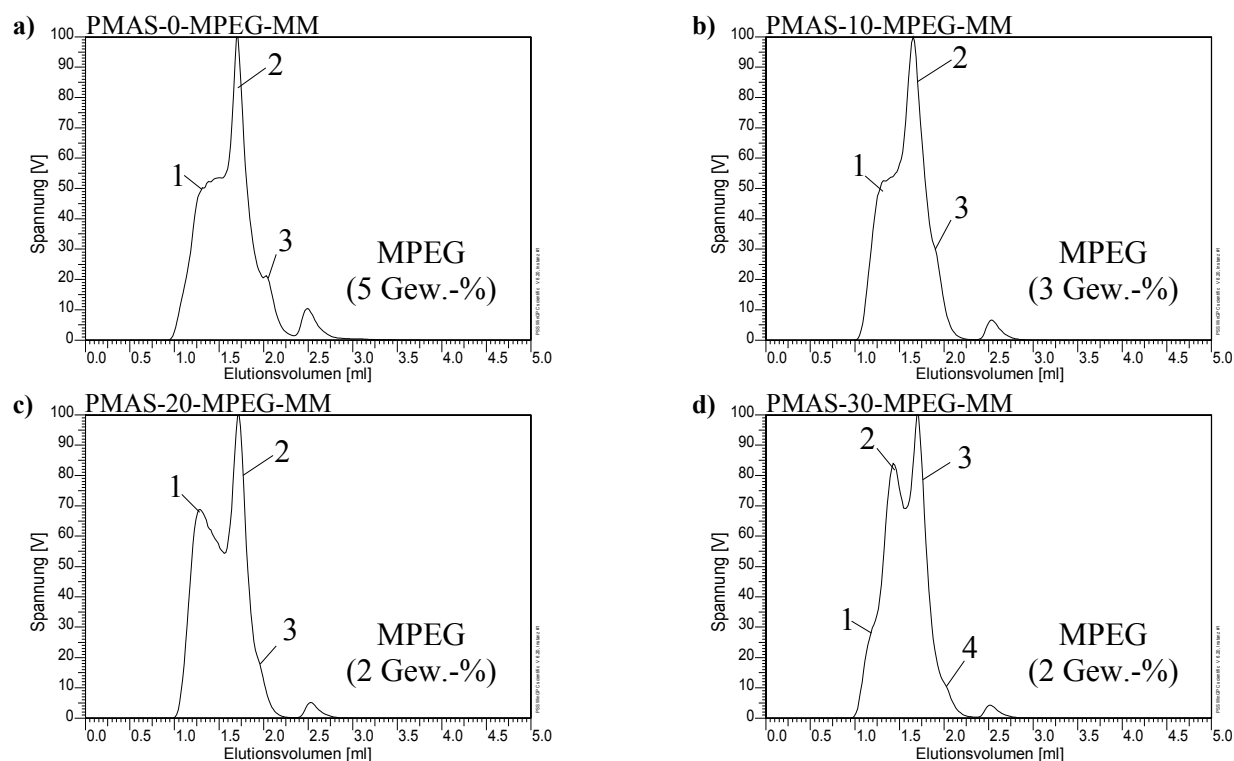


Abb. 4.8: LC-CC-Elugramme der Copolymere PMAS-g-PEG; Bedingungen wie in Abb. 4.6

zwischen 2 und 5 Gew.-%. Das Hauptprodukt ist in allen vier Fällen heterogen und weist bei 1,7 ml ein Peakmaximum auf. Die Heterogenität ist unterschiedlich ausgeprägt. PMAS-20-MPEG-MM und PMAS-30-MPEG-MM weisen bei etwa 1,3 ml deutliche Peakmaxima auf.

Um eine Zuordnung dieser Peaks durchzuführen, wurde das Homopolymer durch LC-CC fraktioniert und mit MALDI-TOF untersucht. Das entsprechende Elugramm mit Angabe der Fraktionen ist in Abb. 4.9 dargestellt.

Mithilfe der MALDI-Spektren in Abb. 4.10 kann erneut bestätigt werden, dass Fraktion 4 im Wesentlichen aus MPEG besteht. In Fraktion 3 ist außer MPEG auch Makromonomeres MPEG-MM enthalten. Fraktion 2 weist neben MPEG-MM eine Oligomerverteilung der Di- bis Tetramere auf. Fraktion 1 enthält höhere Oligomere, die durch MALDI-TOF nicht mehr erfasst werden können.

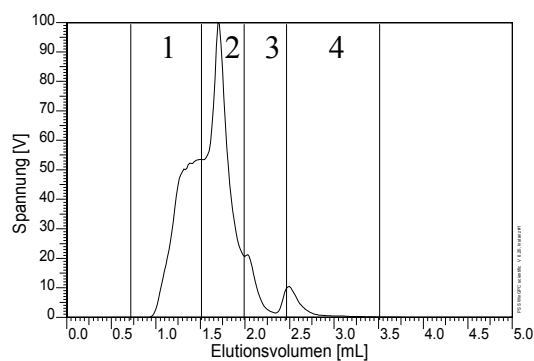
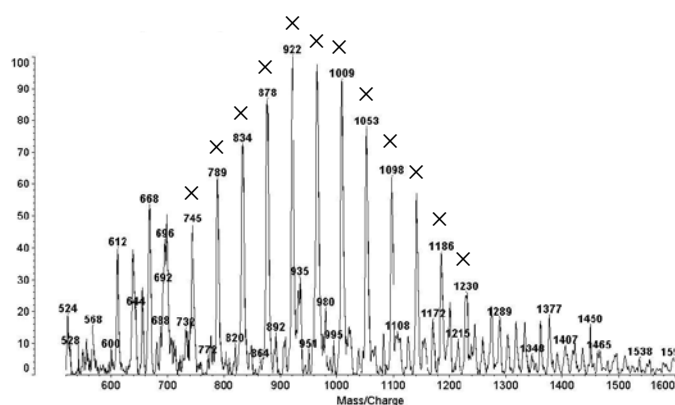
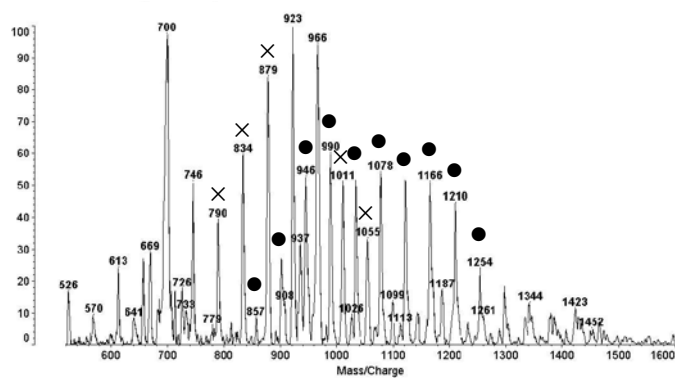


Abb. 4.9: LC-CC-Elugramm von PMAS-0-MPEG-MM mit Angabe der Fraktionen; chromatographische Bedingungen wie in Abb. 4.6

Fraktion 4



Fraktion 3



Fraktion 2

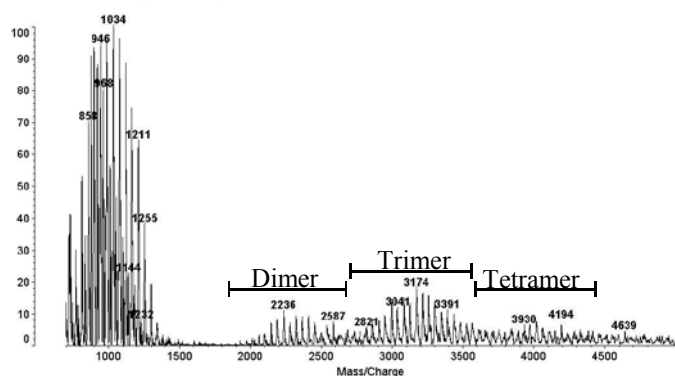


Abb. 4.10: MALDI-TOF-Spektren der Fraktionen von PMAS-0-MPEG-MM Zuordnung: MPEG (x), MPEG-MM (●), DiMPEG (□) und PEG (◆)

4.1.2.2 PEG-g-PMAS-Copolymere

Vor der Untersuchung der Pfropfcopolymeren PEG-g-PMAS wurden deren Edukte PEG 1500 – PEG 6000 am kritischen Punkt der Adsorption für PEG vermessen (Abb. 4.11).

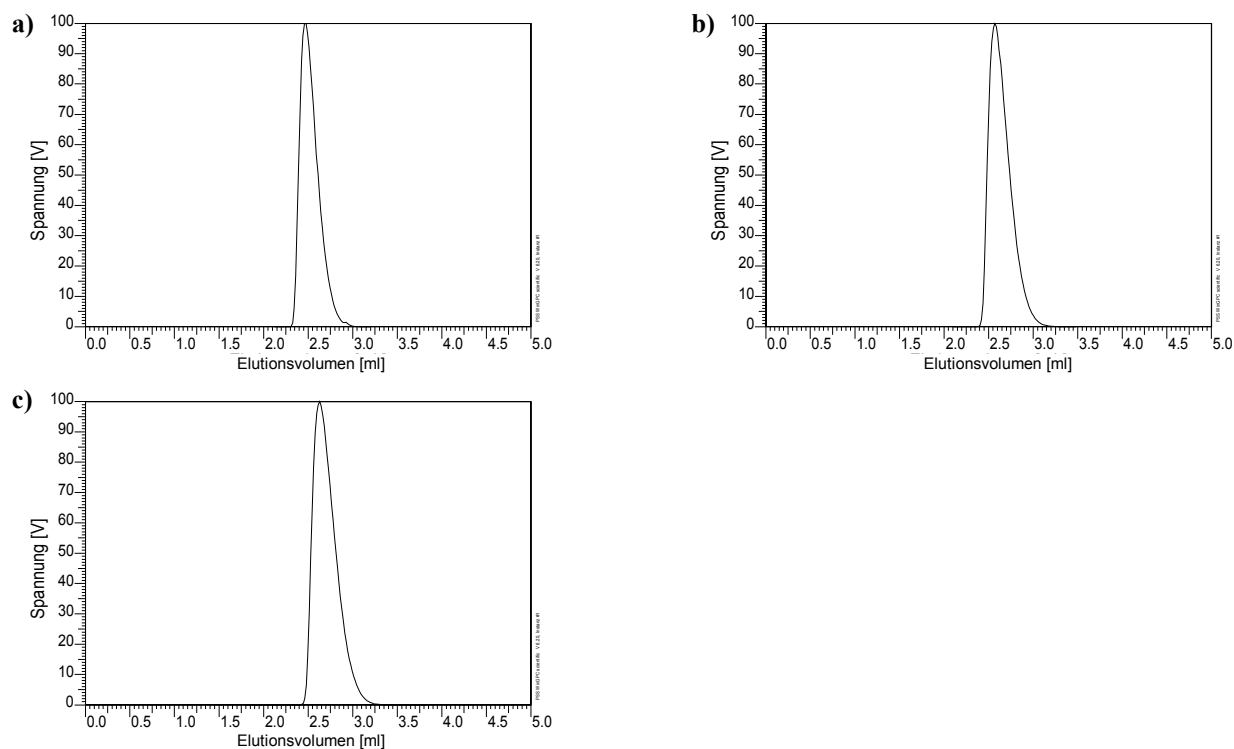


Abb. 4.11: LC-CC-Elugramme der für die Pfropfreaktion eingesetzten PEGs: PEG 1500 (a), PEG 4000 (b), und PEG 6000 (c); chromatographische Bedingungen wie in Abb. 4.6

Die Elugramme zeigen, dass in den Edukten keine Verunreinigungen enthalten sind. Im Anschluss an die Edukte wurden auch die Copolymere mit der LC-CC gemessen. In Abb. 4.12 und Abb. 4.13 sind die Elugramme aller Proben abgebildet. Neben einem Produktpeak im Bereich von 1 – 2,2 ml weisen alle Proben einen weiteren Elutionspeak bei etwa 2,5 ml auf, der dem nichtgepfropften PEG zugeordnet werden kann. Dies wurde durch eine Fraktionierung von PEG-1,5k85-PMAS und Analyse durch MALDI-TOF bestätigt.

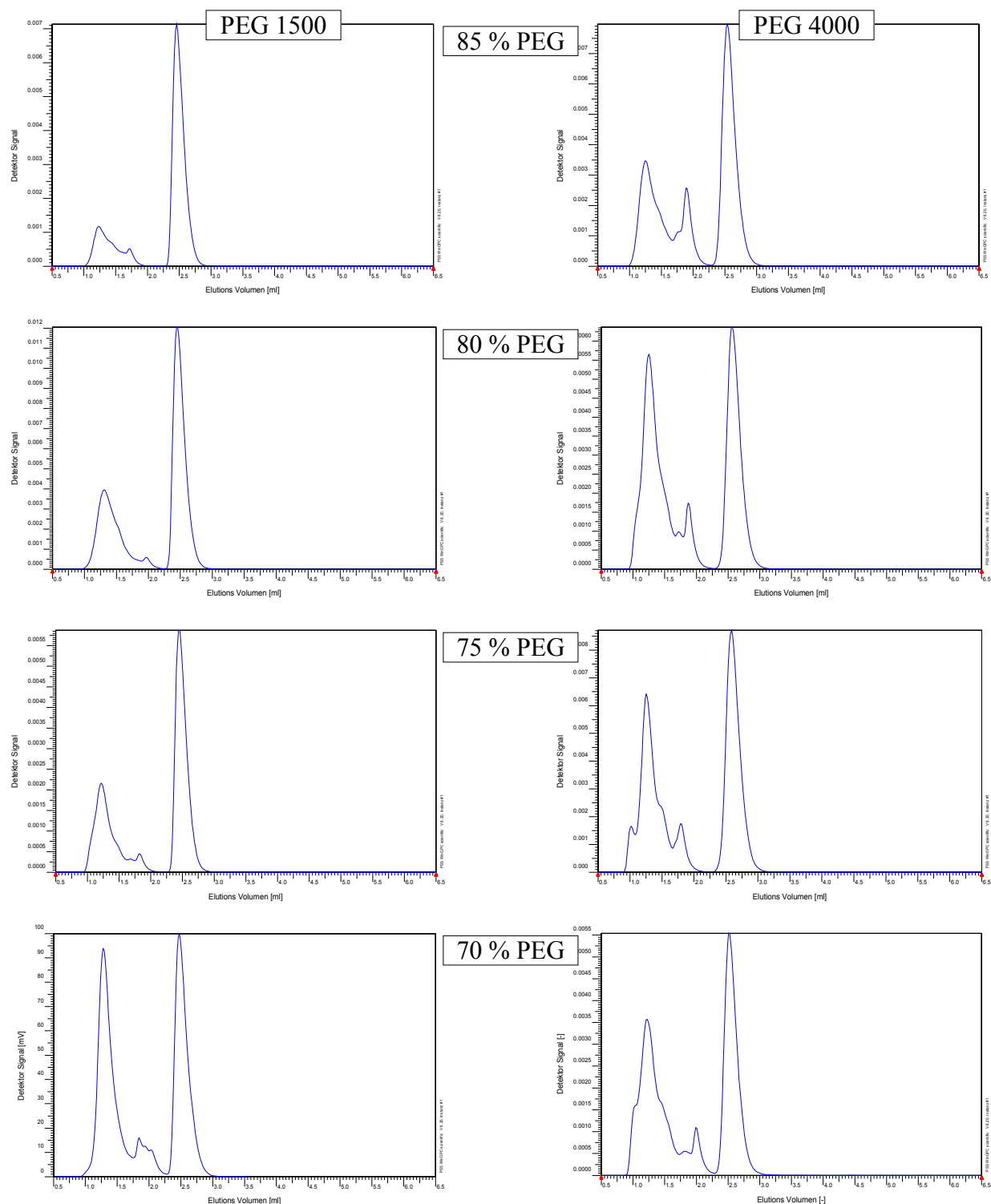


Abb. 4.12: LC-CC-Elugramme der PEG-g-PMAS-Serien mit PEG 1500 und PEG 4000; chromatographische Bedingungen wie in Abb. 4.6

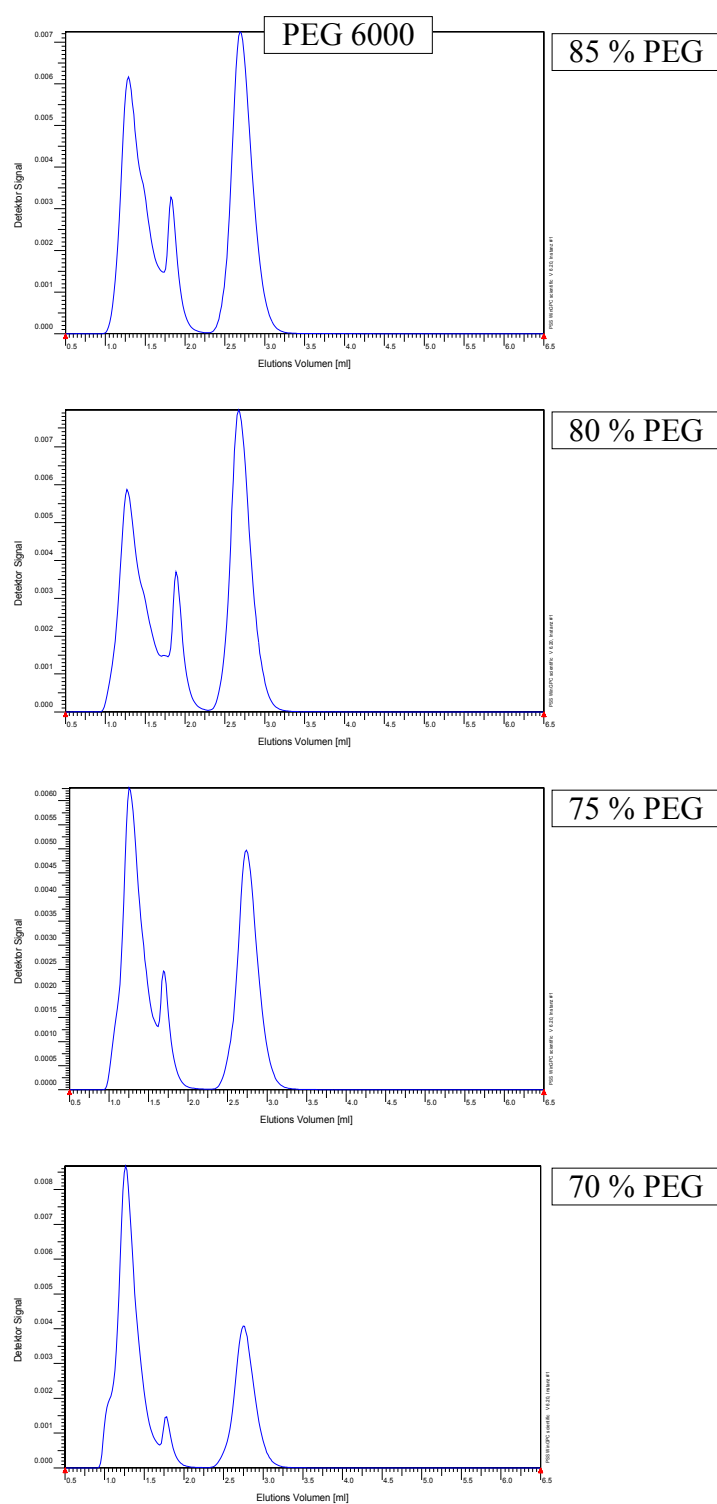


Abb. 4.13: LC-CC-Elugramme der PEG-g-PMAS-Serie mit PEG 6000; chromatographische Bedingungen wie in Abb. 4.6

In Tab. 4.3 sind die Peakflächenanteile des nicht umgesetzten PEGs für alle Teilsereien wiedergegeben. Darin ist der Trend zu erkennen, dass mit sinkendem PEG-Anteil im Edukt auch der Anteil des nicht umgesetzten PEGs im Produktgemisch sinkt. Weiterhin ist zu sehen, dass auch die Serie mit PEG 4000 in allen Fällen zu Pfropfprodukten geführt hat. Dies verdeutlicht, dass nur eine chromatographische Methode unter Umständen keinen ausreichenden Informationsgehalt zur Beschreibung einer komplexen Probe bietet. Die Ergebnisse aus der SEC ließen fälschlicherweise darauf schließen, dass wegen des fehlenden höhermolekularen Anteils bei PEG-4k(85-75)-PMAS kein oder nur wenig Pfropfprodukt gebildet wurde. Diese Aussage kann nun dahingehend geändert werden, dass im Gegensatz zu den anderen Serien und zu PEG-4k70-PMAS nur niedermolekulare Pfropfprodukte gebildet wurden. Das heißt, die Pfropfäste sind entweder kurz oder ihre Anzahl ist so gering, dass dadurch die Molmasse des Eduktes nicht wesentlich verändert wird. Aus den in Tab. 4.3 gezeigten Werten geht hervor, dass in diesem Fall über die Hälfte der PEG-Moleküle gepfropft worden sind.

Tab. 4.3: Flächenanteile (Gew.-%) des unumgesetzten PEGs aus den LC-CC-Elugrammen für PEG-g-PMAS

Eduktanteil PEG	PEG 1500	PEG 4000	PEG 6000
85 %	76 %	52 %	45 %
80 %	62 %	42 %	46 %
75 %	61 %	49 %	40 %
70 %	44 %	44 %	31 %

4.1.3 Kopplung der Flüssigchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass für die Modellsysteme PMAS-g-PEG und PEG-g-PMAS durch wässrige SEC keine Auftrennung in Edukte und Produkte erreicht wird, während die LC-CC Aussagen über die chemische Heterogenität der Proben erlaubt. Eine Zuordnung der Peaks ist entweder durch den direkten Vergleich mit Elugrammen der Einzelkomponenten oder aber durch die Kopplung der Flüssigchromatographie mit spektroskopischen Methoden möglich. Im Folgenden wird gezeigt, welche Informationen durch die offline- und online-Kopplung der FTIR-Spektroskopie resultieren. Dabei wird auch diskutiert, welche Schwierigkeiten in Bezug auf wasserlösliche Polymere auftreten und wie diese beseitigt werden können.

Die Möglichkeiten und Grenzen der FTIR-Spektroskopie sollen anhand des Systems PEG-g-MAS vorgestellt werden.

4.1.3.1 PEG-g-PMAS-Copolymere

Um die PEG-g-PMAS-Copolymere mit FTIR zu untersuchen, wurden diese entsprechend Abb. 4.14 fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden getrocknet, in einem Tropfen Methanol gelöst und auf den ATR-Kristall des FTIR-Spektrometers aufgebracht. Nach Abdampfen des Lösemittels wurden die FTIR-Spektren aufgenommen.

Abb. 4.15 zeigt für PEG-1,5k85-PMAS eine Gegenüberstellung der Spektren der Gesamtprobe, der einzelnen Fraktionen sowie die Spektren von PEG bzw. PMAS. In den Spektren sind drei

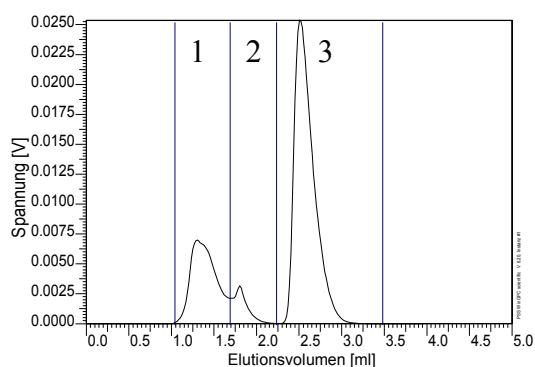


Abb. 4.14: LC-CC-Chromatogramm von PEG-1,5k85-PMAS mit Angabe der Fraktionen; Bedingungen wie in Abb. 4.6

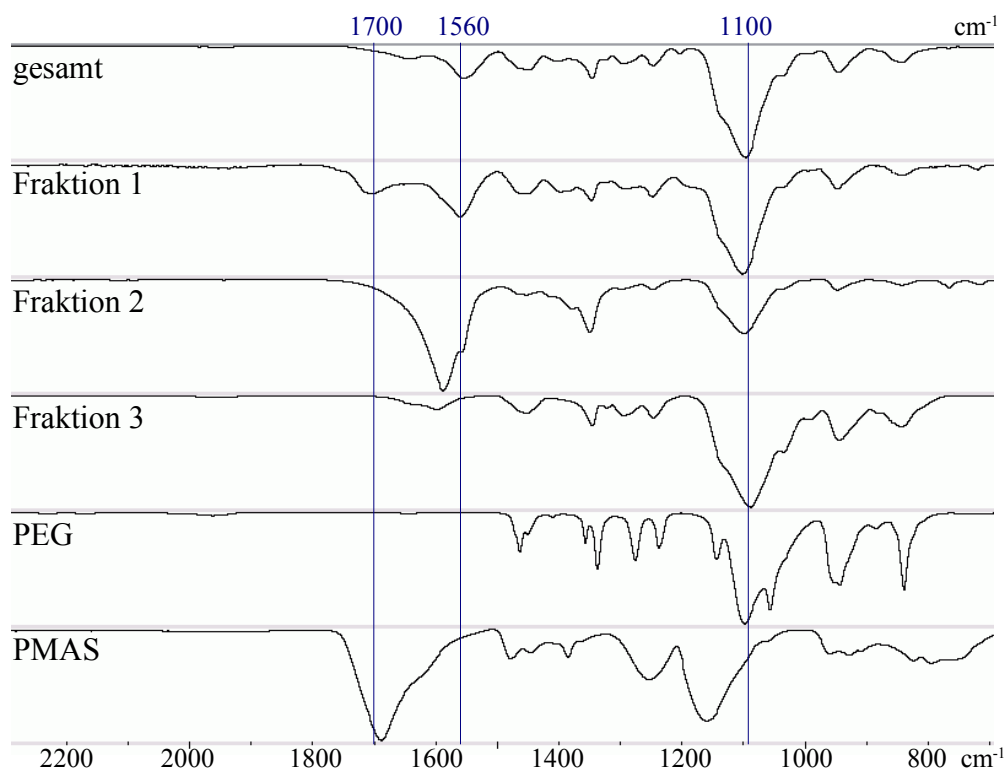


Abb. 4.15: FTIR-Spektren der Fraktionen aus Abb. 4.14; Vergleich mit dem Gesamtspektrum von PEG-1,5k85-PMAS und mit reinem PEG und PMAS

charakteristische Banden markiert. Dies sind die C=O Valenzschwingung der Carboxylgruppe von PMAS bei 1700 cm^{-1} sowie die asymmetrische Valenzschwingung des Carboxylations bei $1560 - 1580\text{ cm}^{-1}$ und die C-O Valenzschwingung des Ethers im PEG bei 1100 cm^{-1} .

Fraktion 3 entspricht – wie zuvor schon mit MALDI-TOF nachgewiesen – dem eingesetzten PEG. Der Vergleich der Spektren von Fraktion 1 und 2 zeigt, dass Fraktion 1 neben der Carboxylatbande eine deutliche Carboxylbande aufweist, während letztere in der zweiten Fraktion nicht mehr nachzuweisen ist. Dafür treten in Fraktion 2 starke Valenzschwingungen im Bereich von 1580 cm^{-1} auf, was darauf schließen lässt, dass an dieser Stelle carboxylathaltige Probenbestandteile eluieren. Die Modellpolymere liegen in neutralisierter Form vor, jedoch berichteten Rufino und Monteiro^[93] sowie Kuzumizu et al.^[94] bereits, dass auch in scheinbar vollständig neutralisierten Proben immer noch nicht dissoziierte Carboxylgruppen vorliegen können. Durch den neutralen, salzfreien Eluenten kann dieser Effekt verstärkt werden. Da die einzelnen Fraktionen unterschiedliche Anteile der Salz- bzw. Säureform aufweisen, sollte zunächst das Elutionsverhalten einer Probe getestet werden, bei der während der Chromatographie das Gleichgewicht entweder ausschließlich auf der Seite der Salz- oder der Säureform liegt.

Ersteres kann erreicht werden, indem ein Eluent mit hoher Ionenstärke und hohem pH-Wert eingesetzt wird, letzteres durch die Überführung der Probe in die Säureform im Vorfeld der chromatographischen Untersuchung. Da der Zusatz von Salzen zum Eluenten weitere Untersuchungen im Anschluss an die Chromatographie erschwert, wurde der zweite Ansatz (Überführung in die Säureform) weiter verfolgt. Ein gängiges, jedoch zeitaufwendiges Verfahren hierfür ist die Dialyse der Probenlösung. Um den Zeitfaktor zu minimieren, wurde die Festphasenextraktion (SPE) zur Probenvorbereitung gewählt. Da diese hauptsächlich für niedermolekulare Substanzen eingesetzt wird, musste zunächst eine Methodenentwicklung durchgeführt werden, um geeignete Materialien auszuwählen. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit Kationentauscher-Kartuschen erzielt. Dabei werden die in der Probe enthaltenen Natriumionen auf dem Ionentauschermaterial adsorbiert, während die salzfreie Polymerlösung eluiert.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch eine HPLC-Methode entwickelt, mit der der Natriumgehalt einer Probe schnell und quantitativ bestimmt werden kann. Dafür wurde eine SAX-Anionentauschersäule eingesetzt. Während neutrale und anionische Probenbestandteile mit dem Säulenmaterial in Wechselwirkung treten, eluieren die kationischen Probenbestandteile (in diesem Fall Natriumionen) zuerst und können quantifiziert werden. Auf diese Weise konnten die Ergebnisse der SPE überprüft werden.

Da eine Quantifizierung der Natriumionen möglich ist, wurden auch die in ihrer Salzform vorliegenden Copolymere untersucht. Unter der Annahme, dass diese vollständig neutralisiert vorliegen, und die injizierte Probenmenge bekannt ist, kann der Massenanteil an Natrium in Bezug auf die Probenmenge bestimmt werden. Da aufgrund der Elektroneutralität equimolare Anteile an Natrium- und Carboxylationen vorhanden sind, kann somit auch der Carboxylatanteil der Probe aus dem Natriumanteil berechnet werden. Daraus resultiert die Bruttozusammensetzung des Probengemisches. Abb. 4.16 zeigt, dass mit dieser Methode Werte erhalten werden, die gut mit den ursprünglichen Eduktzusammensetzungen übereinstimmen.

In Abb. 4.17 sind die Elugramme der neutralisierten und der Säureform von PEG-1,5k85-PMAS gegenübergestellt. Dabei ist eine Veränderung der Elutionsform zu beobachten.

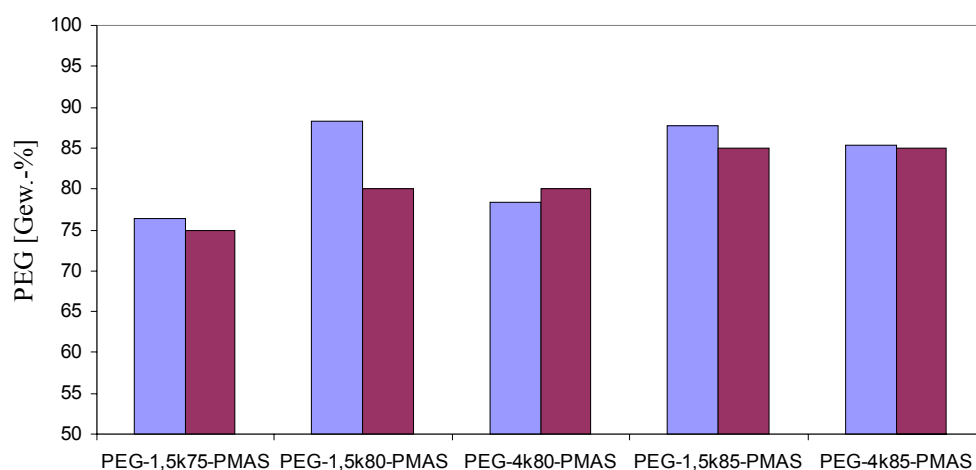


Abb. 4.16: Berechnung des PEG-Gehaltes aus der HPLC mit einer Anionentauschersäule; Vergleich Eduktzusammensetzung (blau) und bestimmter Gehalt (rot); wässrige Lösung, Detektor: ELSD

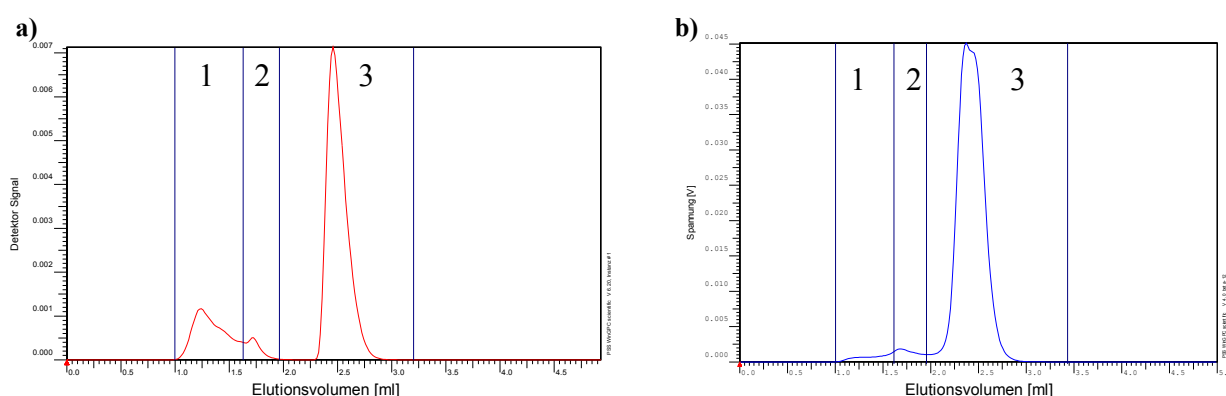


Abb. 4.17: Vergleich der LC-CC-Elugramme von PEG-1,5k85-PMAS in neutralisierter Form (a) und in Säureform (b); chromatographische Bedingungen wie in Abb. 4.6

Um das Verhältnis von PMAS und PEG in den Gesamtproben und in den Fraktionen bestimmen zu können, wurde eine entsprechende Kalibration für die FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Zur FTIR-

Kalibration für das Salz/Säure-Verhältnis wurden Kalibrationsstandards durch Titration von PMAS mit Natronlauge erstellt. Dies ist notwendig, da unterschiedliche funktionelle Gruppen spektroskopische Banden verschiedener Intensität aufweisen und bei einer Quantifizierung ihre Responsefaktoren berücksichtigt werden müssen. Die Berechnung erfolgt dabei über das Lambert-Beersche-Gesetz (Gl. 2.11), wobei die Absorption proportional zur Peakhöhe H im FTIR-Spektrum ist. Zur Auswertung wurden die Höhen der folgenden Banden eingesetzt: 1100 cm^{-1} (PEG), 1710 cm^{-1} (PMAS-Säure), 1550 cm^{-1} (PMAS-Salz). Der Absorptionskoeffizient entspricht dem zu bestimmenden Responsefaktor k . Durch Einsetzen des Peakhöhenverhältnisses für zwei Komponenten 1 und 2 ergibt sich:

$$\frac{H_1}{H_1 + H_2} = \frac{c_1 \cdot k_1}{c_1 \cdot k_1 + c_2 \cdot k_2} \quad (4.1)$$

Nach Umformen und Ersetzen der Massenanteile

$$\frac{c_1}{c_1 + c_2} = x_1 \quad \text{und} \quad \frac{c_2}{c_1 + c_2} = x_2; \quad x_1 + x_2 = 1$$

kann eine einfache Beziehung erhalten werden (Gl. 4.2). Diese entspricht einer Geradengleichung der Form $y = m \cdot x + b$.

$$\frac{H_2}{H_1} = -\frac{k_2}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{1}{x_1} \quad (4.2)$$

Aus der entsprechenden Auftragung der erhaltenen Kalibrationsdaten kann das Verhältnis k_2/k_1 der Responsefaktoren aus der Steigung und dem Achsenabschnitt bestimmt werden.

Aus Abb. 4.18 resultiert: $\frac{k_{\text{PMAS-Säure}}}{k_{\text{PEG}}} = 0,1672$ und $\frac{k_{\text{PMAS-Säure}}}{k_{\text{PMAS-Salz}}} = 0,855$.

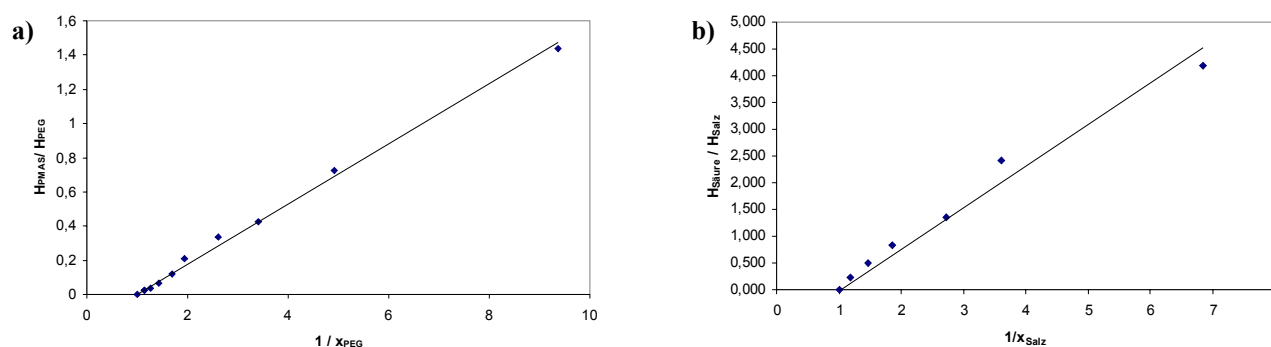


Abb. 4.18: FTIR-Kalibration der Peakhöhenverhältnisse von PMAS und PEG (a) sowie der Peakhöhenverhältnisse der Carboxylgruppen und Carboxylationen von PMAS (b)

Mithilfe der so bestimmten Faktoren wurde sowohl für die neutralisierte als auch für die Säureform der Proben der PEG-Gehalt bestimmt. Ähnliche Studien wurden auch von Rufino und Monteiro^[93] sowie Chiu et al.^[95] unternommen. Sie führten FTIR-Messungen an unterschiedlich stark neutralisierten P(MMA-co-MAS) Copolymeren beziehungsweise acrylsäurehaltigen Dextran-Hydrogelen durch, um den Einfluss der Copolymerzusammensetzung und des pH-Wertes in der IR-Spektroskopie zu untersuchen. In beiden Publikationen werden jedoch lediglich die Carbonsäure- und Carboxylat-Banden und keine zusätzlichen funktionellen Gruppen betrachtet.

Die PEG-Anteile, die mithilfe der Kalibrationen aus Abb. 4.18 erhalten wurden, lagen jedoch zwischen 20 und 50 % niedriger als die aus der Eduktzusammensetzung erwarteten und in Abb. 4.15 bestätigten Werte. Der Grund dafür liegt nicht in einer fehlerhaften Kalibration, sondern darin, dass die Proben in methanolischer Lösung auf den ATR-Kristall des IR-Spektrometers aufgebracht werden, um nach Verdampfen des Lösemittels einen Polymerfilm zu bilden. Dabei werden PEG und vermutlich auch stark PEG-haltige Copolymere weniger gut erfasst als die PMAS-reichen Copolymere. Eine mögliche Erklärung sind die unterschiedlichen Löslichkeiten der Probenbestandteile, wodurch die Zusammensetzung der Lösung, welche auf den ATR-Kristall aufgebracht wird, bereits nicht mehr der eigentlichen Probenzusammensetzung entspricht. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen und auch eine eventuell auftretende Mikrophasenseparation durch die langsame Trocknung der Probenlösung auf dem ATR-Kristall zu verhindern, ist die online-LC-FTIR-Kopplung. Diese Kopplungen werden mit dem in Kapitel 2.9 beschriebenen Interface LC-Transform durchgeführt. Bei wasserhaltigen Eluenten müssen aufgrund der schlechten Verdampfbarkeit des Wassers die Parameter des Gerätes so eingestellt werden, dass die Proben gleichmäßig auf die Germaniumscheibe aufgesprüht werden und schnell trocknen. Nach dem Aufsprühen kann im scheinbar trockenen Film anhand einer IR-Bande bei 1640 cm^{-1} immer noch Wasser nachgewiesen werden. Zum vollständigen Entfernen des Wassers wird die Germaniumscheibe vor dem Abrastern im Spektrometer für mindestens zwei Stunden im Trockenschrank getrocknet. Abb. 4.19 zeigt einen 3D-Plot der LC-FTIR-Analyse von PEG-1,5k85-PMAS. Die chromatographische Trennung erfolgte dabei durch LC-CC.

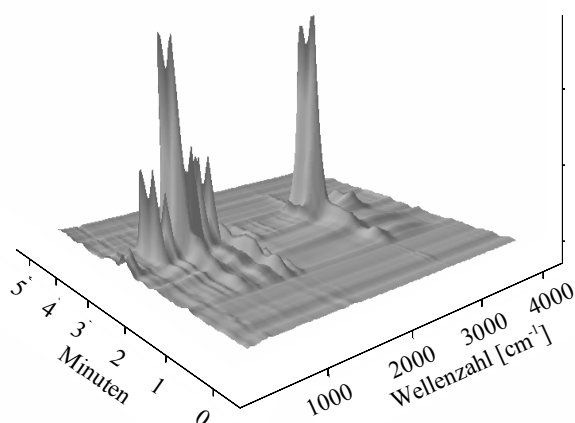


Abb. 4.19: 3D-Plot der LC-FTIR-Analyse von PEG-1,5k85-PMAS

Durch die Bestimmung der Peakhöhen für die spezifischen Banden bei 1100 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} und

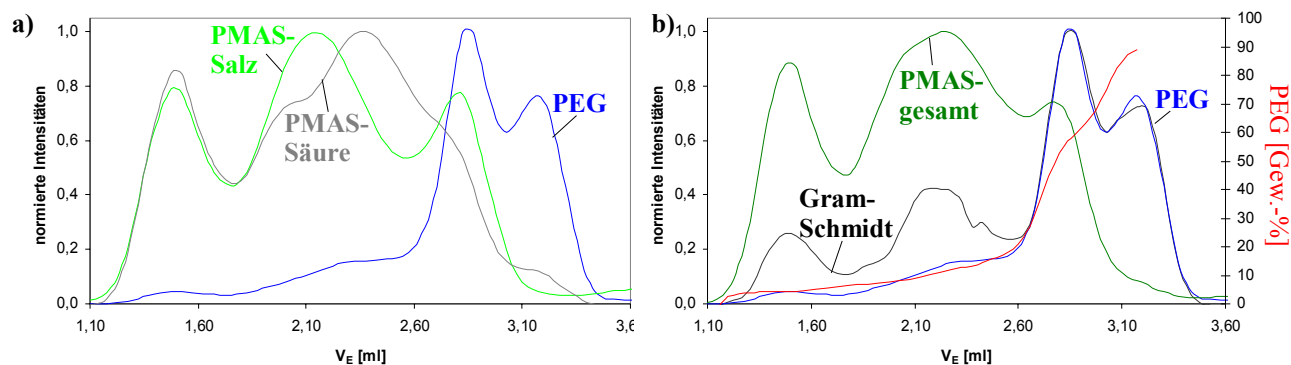


Abb. 4.20: LC-FTIR-Analyse von PEG-1,5k85-PMAS: a) normierte Peakhöhen der spezifischen Banden für PEG (1100 cm^{-1} , blau), PMAS (1723 cm^{-1} , grau), PMAS-Salz (1550 cm^{-1} , hellgrün) und b) Gram-Schmidt-Darstellung (schwarz), PEG (1100 cm^{-1} blau), berechneter gesamt PMAS-Anteil (grün) und daraus ermittelter PEG-Anteil in Gew.-% (rot); LC-CC-Bedingungen wie in Abb. 4.6

1723 cm^{-1} (Abb. 4.20 a) wird über die Kalibrationen aus Abb. 4.18 eine Umrechnung in die Summe der Massenanteile von PMAS-Säure und PMAS-Salz und daraus in den PEG-Massenanteil (rote Kurve in Abb. 4.20 b) möglich. Um die PEG-Verteilung in das LC-CC-Elugramm einordnen zu können, ist zusätzlich die Gram-Schmidt-Darstellung überlagert, die aus der Gesamtintensität der Spektren erhalten wird und dem Elugramm aus der Chromatographie entspricht. Geringe Abweichungen von den Elutionsformen der Gram-Schmidt-Darstellung von Abb. 4.12 kommen durch eine ungleichmäßige Auftragung auf die Germanium-Scheibe zustande.

Eine Betrachtung der in Abb. 4.20 aufgeführten Kurven zeigt, dass der zuerst eluierende Peak bei 1,5 ml mehr MAS enthält als der Produktpeak bei 2,2 ml. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Pfropfreaktion ein PMAS-reiches und ein PMAS-armes Produkt entstanden sind. Innerhalb dieser Copolymerfraktionen gibt es unterschiedlich stark neutralisierte Bereiche. Das Ergebnis der offline-

Fraktionierung ließ vermuten, dass zuerst die Säure- und dann die Salzgruppen eluieren. Nun wird deutlich, dass dieser Anschein durch eine zu grobe Fraktionierung erweckt wurde. Auf einen Bereich, in dem tatsächlich mehr Carboxylat-Banden auftreten (ca. 2 ml), folgt in der LC-CC wieder ein Bereich mit intensiven Carbonsäure-Banden (ca. 2,5 ml). Ähnliche Tendenzen werden auch für die anderen PEG-g-PMAS-Copolymere erhalten. Als ein weiteres Beispiel sei in Abb. 4.21 das Diagramm der LC-FTIR-Kopplung von PEG-4k80-PMAS gezeigt.

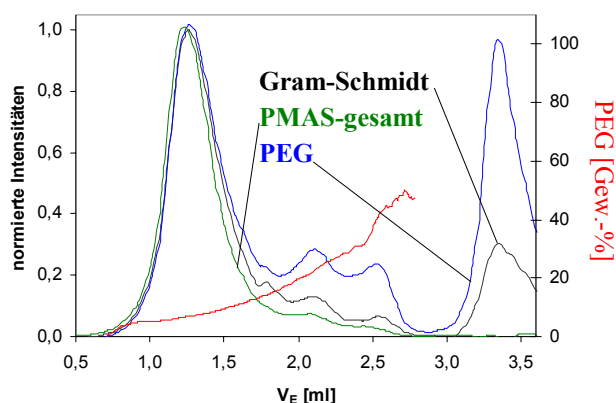


Abb. 4.21: LC-FTIR-Analyse von PEG-4k80-PMAS: Gram-Schmidt-Darstellung (schwarz), PEG (1100 cm^{-1} blau), berechneter gesamt PMAS-Anteil (grün) und daraus ermittelter PEG-Anteil in Gew.-% (rot); LC-CC-Bedingungen wie in Abb. 4.6

4.1.3.2 PMAS-g-PEG-Copolymere

Auch für die PMAS-g-PEG-Copolymere wurden offline- und online-Kopplungen mit der FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Ähnlich wie bei den bisher erhaltenen Ergebnissen zeigte sich jedoch, dass diese Copolymere im Vergleich zu den PEG-g-PMAS-Copolymeren einheitlich aufgebaut sind. Zudem wird durch die veränderte chemische Umgebung der MAS-Einheiten (PMAS im Rückgrat) eine Verschiebung der charakteristischen Banden hervorgerufen, wodurch die zuvor verwendete Kalibration nicht mehr angewendet werden kann (1585 cm^{-1} statt 1550 cm^{-1}). Dies wurde auch von Rufino und Monteiro beschrieben.^[93] In Abb. 4.22 sind für PMAS-30-MPEG-MM die Höhen der spezifischen Banden für PEG und PMAS in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen aufgetragen. Dabei sind keine großen Unterschiede in der Verteilung der Intensitäten zu erkennen. Bei einem exakten Vergleich bestätigt sich jedoch auch hier, was für die PEG-g-PMAS-Copolymere galt: Der zuerst eluierende Copolymeranteil ist PMAS-reicher.

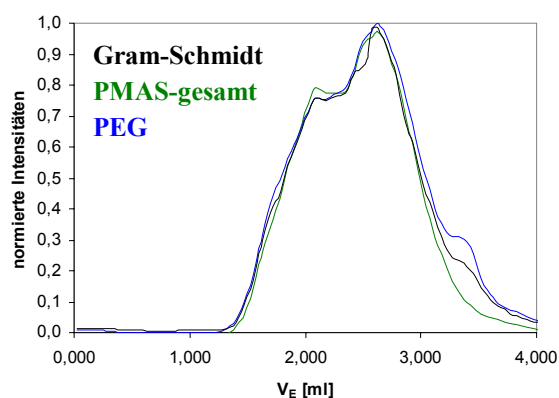


Abb. 4.22: LC-FTIR-Analyse von PMAS-30-MPEG-MM: Gram-Schmidt-Darstellung (schwarz), PEG-Bande (blau) und PMAS-Banden (grün); LC-CC-Bedingungen wie in Abb. 4.6

4.1.4 Zweidimensionale Flüssigchromatographie

Aus den bisher gezeigten Messungen konnten keine Informationen über die Molmassenverteilung der Copolymere und insbesondere über die der Fraktionen erhalten werden, welche in der LC-CC getrennt und mittels LC-FTIR-Analyse identifiziert wurden. Die einzige Möglichkeit, Molmasseninformationen über die einzelnen Probenbestandteile zu erhalten, besteht durch eine Kopplung der chromatographischen Methoden der SEC und der LC-CC. Diese kann durch eine zeit- und arbeitsaufwendige Fraktionierung der LC-CC und anschließende Analyse der Fraktionen mit der wässrigen SEC verwirklicht werden. Wesentlich zeitsparender und komfortabler ist eine online-Kopplung der beiden Methoden. Bei der Chromatographie in wässrigen Medien treten jedoch eine Reihe von Problemen auf, die beim Arbeiten mit organischen Eluenten nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden bisher keine derartigen Kopplungen für wässrige Systeme durchgeführt.

Bei der Entwicklung der Einzelmethode muss auch besonders auf die Kompatibilität der Eluenten beider Methoden geachtet werden. Dies betrifft deren Mischbarkeit, aber auch die Detektierbarkeit mit zur Verfügung stehenden Detektoren. Mehrere Gründe sprechen dafür, weshalb zuerst eine Trennung nach chemischer Heterogenität und dann die SEC erfolgen sollte. Zunächst sei das prinzipielle Problem genannt, dass in der SEC nach dem hydrodynamischen Volumen und nicht nach der Molmasse getrennt wird. Bei einer Größenausschlusschromatographie in der ersten Dimension würden alle Komponenten mit dem gleichen hydrodynamischen Volumen ebenfalls gleich eluieren – unabhängig von ihrer Chemie und der tatsächlichen Molmasse. Dies bedeutet, dass zu keinem späteren Zeitpunkt eine exakte Zuordnung der Molmassen durchgeführt werden kann, selbst wenn entsprechende Kalibrationen für die einzelnen Komponenten zur Verfügung stehen

sollten. Neben diesen prinzipiellen Überlegungen muss zusätzlich auch beachtet werden, dass eine HPLC-Säule (für die LC-CC) mit mehr Substanz beladen werden kann als eine SEC-Säule. Dies ist deshalb wichtig, weil in der 2D-Chromatographie größere Konzentrationen (30 g/l anstatt 3 g/l) eingesetzt werden als bei eindimensionalen Messungen. Die Probenmenge muss auch nach der online-Fraktionierung in der ersten Dimension so groß sein, dass eine Detektion nach der Trennung in der zweiten Dimension möglich ist. Diese Voraussetzung muss auch in der „organischen“ 2D-Chromatographie erfüllt sein. Spezifisch für Wasser ist jedoch zusätzlich das Problem, dass das Salz aus der SEC unter Umständen in (teils organischen) Eluenten der HPLC ausfallen und das System blockieren würde. Durch die Reihenfolge HPLC-SEC werden die genannten Schwierigkeiten verringert. Zwei Probleme müssen jedoch im Zusammenhang mit Wasser bzw. Elektrolytlösungen als Eluent berücksichtigt werden. Wasser hat eine hohe Viskosität und kann deshalb bei Raumtemperatur nur mit einer für die eindimensionale SEC üblichen Flussrate (bis zu 1 ml/min) eingesetzt werden, ohne einen zu hohen Gegendruck zu erzeugen. Bei Erhöhung der Flussrate könnte der Gegendruck die Lebensdauer der Säulen beeinträchtigen und – wichtiger noch – eine Scherung der Probe und somit Verfälschung der Molmasse hervorrufen. Viel entscheidender ist jedoch das Problem der Detektion in der wässrigen 2D-Chromatographie. Üblicherweise wird in der 2D-Chromatographie ein ELSD als Detektor eingesetzt, mit dem der Eluent verdampft und die entstehenden Probenpartikel detektiert werden. In der wässrigen SEC ist jedoch der Einsatz eines solchen Detektors nicht möglich, da die im Eluenten enthaltenen Salze zunächst Salzpartikel bilden, die das Signal/Rauschverhältnis des Detektors verschlechtern und schließlich die Verdampfungsdüse verstopfen. Dadurch würde das Gerät unbrauchbar gemacht. Alternativ kann ein UV-Detektor eingesetzt werden. Dies setzt jedoch voraus, dass die Proben UV-aktiv sind, was häufig – wie auch bei den vorliegenden Polymersystemen – nicht der Fall ist. RI-Detektoren können nicht eingesetzt werden, da sie auf jede Änderung im Brechungsindex empfindlich reagieren. Mit den Transferinjektionen aus der ersten Dimension wird ein organischer Eluent in ein wässriges System injiziert. Die durch das Lösemittel hervorgerufenen RI-Signale in der zweiten Dimension sind zu intensiv, um daneben einen Probenpeak geringer Konzentration auswerten zu können.

Selbst bei in Einzelfällen vorliegenden chromatographischen Methoden für beide Dimensionen ist es deshalb bisher aufgrund des Detektionsproblems niemandem gelungen, eine wässrige 2D-Chromatographie für hydrophile Copolymere zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht versucht, eine neue Detektionsmethode zu entwickeln, sondern die chromatographische Methode so zu optimieren, dass sie bei gleicher Leistungsfähigkeit

mit bestehenden Detektionsmethoden für die 2D-Chromatographie eingesetzt werden kann. Hierbei wurden die nichtflüchtigen Salze des Eluenten durch ein verdampfbares Salz (Ammoniumacetat) ersetzt. Dies erlaubte den Einsatz eines ELSD als Detektor für die wässrige 2D-Chromatographie. Die Elutionsform der so erhaltenen SEC-Elugramme entspricht der, die zuvor in einer wässrigen Lösung nicht verdampfbarer Salze und mit RI-Detektion erhalten wurde. Dies sei exemplarisch anhand der Elugramme von PEG 6k mit RI-Detektion und mit ELSD gezeigt. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Salzpeak, der im RI genauso intensiv werden kann wie der Produktpeak selbst, mit ELSD nicht mehr zu sehen ist.

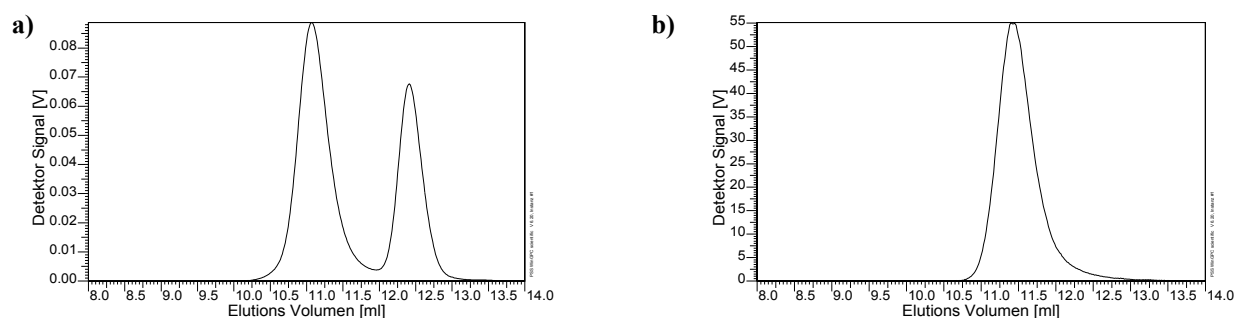


Abb. 4.23: SEC-Elugramme von PEG 6k; chromatographische Bedingungen:
stationäre Phase: Suprema linear M (300 x 8 mm i.d.); Flussrate: 1 ml/min
a) mobile Phase: Wasser + 0,08 M TRIS + 0,15 M NaCl + 0,01 M NaN₃, pH 7; Detektor: RI
b) mobile Phase: 0,02 M Ammoniumacetat in Wasser; Detektor: ELSD

Die Modifikation der Detektionsbedingungen erlaubt erstmals den Einsatz der 2D-Chromatographie für wässrige Systeme. Zur Verringerung des Säulendruckes bei hohen Flussraten können speziell optimierte Säulendimensionen eingesetzt werden. Durch Verkürzen der Säulenlänge von 300 mm auf 50 mm und Anpassen des Säulendurchmessers von 8 mm auf 20 mm wird die SEC-Trennung immer noch im gleichen Säulenvolumen durchgeführt, der Gegendruck der Säule wird jedoch stark reduziert, weshalb auch hohe Flussraten verwirklicht werden können. Im Fall von SDV-Säulen mit THF als Eluent kann so ein Fluss von bis zu 10 ml/min erzielt werden. Die Limitierung liegt hier nicht mehr bei der Säule, sondern wird durch die Grenzen der Pumpen- und Detektorleistung bestimmt. Für wässrige Systeme können auch bei optimierten Bedingungen keine Flussraten in dieser Höhe erreicht werden. Aufgrund der hohen Viskosität des Wassers sind maximal 6 – 7 ml/min für diese „High-Speed“ Säulen angegeben. Dies ist für ein optimiertes System mit RI-Detektion durchführbar. In der wässrigen 2D-Chromatographie muss jedoch gewährleistet werden, dass das Eluat vollständig im ELSD verdampft wird, was bei Wasser nur für Flussraten bis maximal 2 ml/min möglich ist.

4.1.4.1 PEG-g-PMAS-Copolymere

Die Gesamtanalysendauer in der 2D-Chromatographie wird durch das Gesamtvolumen der ersten Dimension, das Probenschleifenvolumen und die Zeit zwischen zwei Injektionen in der zweiten Dimension bestimmt. Sie lässt sich leicht berechnen nach:

$$\text{Gesamtdauer} = \frac{[\text{Volumen 1. Dimension}] \cdot [\text{Zeit bis zum nächsten Transferinjekt}]}{[\text{Volumen der Probenschleife}]}$$

Für die ersten Messungen galt: $\text{Gesamtdauer} = \frac{[5 \text{ ml}] \cdot [12,5 \text{ min}]}{[0,2 \text{ ml}]} = 312,5 \text{ min}$

Innerhalb dieser Zeit wurden 25 Transferinjektionen durchgeführt. Eine gestaffelte Anzeige dieser Transferinjektionen ist in Abb. 4.24 dargestellt. Aus den einzelnen Elugrammen wird schließlich ein Konturplot erstellt. In Abb. 4.25 sind die 2D-Konturplots von PEG-4k85-PMAS und PEG-4k70-PMAS abgebildet.

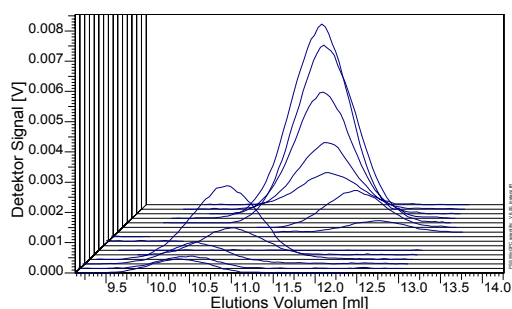


Abb. 4.24: Gestaffelte Anzeige der Transferinjektionen (Ausschnitt) aus einer 2D-Messung; chromatographische Bedingungen siehe Abb. 4.25

Die verwendeten Säulen waren eine HPLC-Säule RP18 und eine analytische SEC-Säule für wässrige Anwendungen. Sehr deutlich ist das nicht umgesetzte PEG für beide Proben bei einem Elutionsvolumen von 3 ml in der ersten Dimension zu sehen. Durch eine Farbcodierung können mithilfe des nebenstehenden Farbbalkens die Linien des Konturplots, wie die Höhenlinien einer geographischen Karte, bestimmten Intensitäten zugeordnet werden.

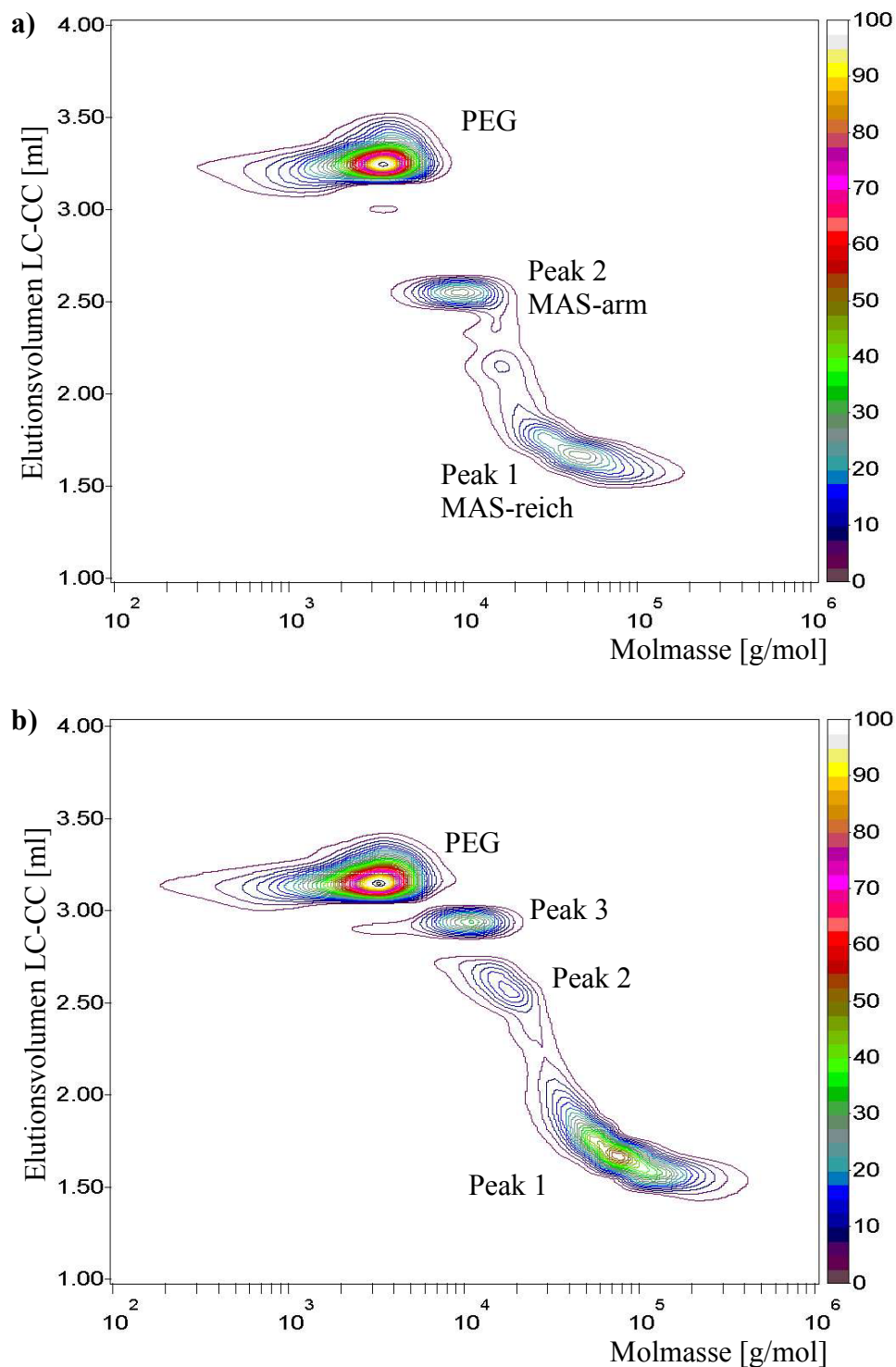


Abb. 4.25: 2D Konturplots von PEG-4k85-PMAS (a) und PEG-4k70-PMAS (b); LC-CC (erste Dimension): stationäre Phase: Nucleosil 100 RP 18 (250 x 4,6 mm i.d.), mobile Phase: Methanol/Wasser 81/19 (w/w), Flussrate: 0,016 ml/min; SEC (zweite Dimension): stationäre Phase: Suprema linear M, analytisch (300 x 8 mm i.d.), mobile Phase: 0,02 M Ammoniumacetat in Wasser, Flussrate: 1 ml/min; Injektion alle 12,5 min, Gesamtanalysendauer: 312 min (bei 200 μ L Probenschleife)

Bei PEG-4k85-PMAS können neben dem PEG zwei Copolymere als separate Peaks mit Molmassen von etwa 50.000 g/mol (Peak 1) und 10.000 g/mol (Peak 2) erkannt werden. Aus der SEC allein war es aufgrund der großen Konzentrationsunterschiede der einzelnen Komponenten nicht möglich, neben dem PEG einen höhermolekularen Anteil in der Probe festzustellen.

Diese Beobachtungen heben bereits zwei wichtige Vorteile der 2D-Chromatographie hervor: Probenbestandteile geringer Konzentration, die eindimensional nicht nachweisbar sind, können abgetrennt und sichtbar gemacht werden. Zudem wird eine wesentlich bessere Auflösung für die einzelnen Komponenten erreicht, sodass eine isolierte Auswertung möglich ist.

Peak 1 von PEG-4k85-PMAS kann anhand der bisherigen Ergebnisse einem MAS-reichen, Peak 2 einem MAS-ärmeren Copolymer zugeordnet werden. Durch den Vergleich mit dem Konturplot von PEG-4k70-PMAS, in dem noch ein dritter Copolymerpeak (Peak 3) enthalten ist, wird gezeigt, dass mit steigendem MAS-Gehalt bei der Pfropfung mehr und zunehmend höhermolekulare Copolymere gebildet werden. Die durch eine PEG-Kalibration erhaltenen Molmassen und die Volumenanteile der Komponenten sind in Tab. 4.4 angegeben. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Molmassen für Peak 1 beim Erhöhen des PMAS-Anteils von 15 % auf 30 % fast verdoppeln. Die Abweichung der Molmassen für das eingesetzte PEG 4000 resultiert durch Fehler in der Kalibrierkurve.

Tab. 4.4: Auswertungen der Konturplots von Abb. 4.25

	V (PEG)	V (Peak 1)	V (Peak 2)	V (Peak 3)
PEG-4k85-PMAS	56 %	22 %	11 %	
PEG-4k70-PMAS	49 %	32 %	7 %	8 %
	M_w(PEG)	M_w(1)	M_w(2)	M_w(3)
PEG-4k85-PMAS	3.100	51.300	10.000	
PEG-4k70-PMAS	2.900	93.600	17.500	10.300

Um eine noch bessere Auflösung erlangen zu können, müssen kleinere Probenschleifen eingesetzt werden. Die Verringerung von 200 µl auf 100 µl bedeutet aber gleichzeitig auch eine Verdoppelung der Analysendauer. Dies wären im Fall der gezeigten Konturplots über 600 min, also 10 Stunden. Da in der wässrigen SEC die Flussrate selbst mit HighSpeed-Säulen nicht wesentlich erhöht werden kann, wurde ein anderes Mittel zur Verkürzung der Analysendauer eingesetzt. In der SEC eluieren die Proben in einem definierten Elutionsbereich, nämlich zwischen der Ausschlussgrenze und dem Punkt der totalen Permeation, sodass die Transferinjektionen mit einem Versatz injiziert werden können. Dies ist in Abb. 4.26 anschaulich dargestellt.

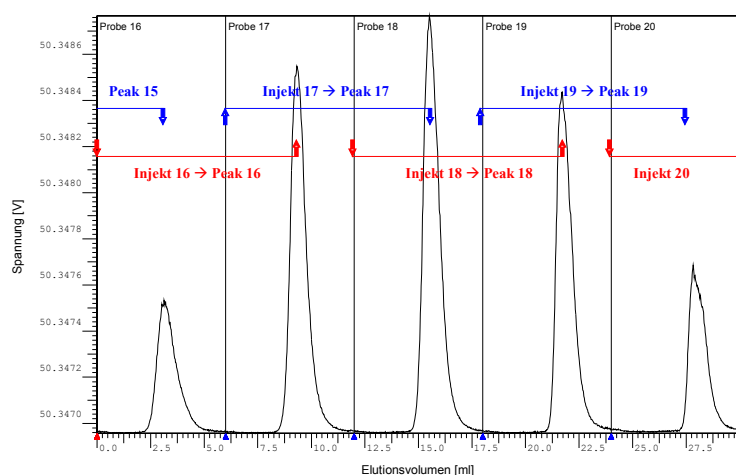


Abb. 4.26: Schema des versetzten Injizierens

Durch die Optimierung des Versatzes und durch eine Erhöhung der Flussrate bis auf 2,5 ml/min konnte eine Verringerung der Analysendauer um den Faktor 5 erreicht werden. Abb. 4.27 zeigt die Konturplots für die gleichen Proben bei einer Flussrate von 2,5 ml/min in der zweiten Dimension. Sehr deutlich ist zu erkennen, dass bei dieser Flussrate die Leistungsgrenze des verwendeten ELSD erreicht ist (unscharfe und verrauschte Konturen). Ein Vergleich der Tabellen 4.4 und 4.5 zeigt jedoch, dass die Anteile der Komponenten in den Konturplots sehr gut übereinstimmen. Die Abweichungen bei den Molmassen sind durch ungenaue Kalibrationen und Flussschwankungen in der SEC begründet. Zudem ist es aufgrund des schlechten Signal/Rauschverhältnisses schwierig, die hochmolekulare Flanke der einzelnen Peaks auszuwerten. Dies ist ein Grund dafür, weshalb Peak 1 für das Copolymer PEG-4k70-PMAS scheinbar nur eine um etwa 25 % höhere Molmasse hat als für das Copolymer PEG-4k85-PMAS.

Tab. 4.5: Auswertungen der Konturplots von Abb. 4.27

	V (PEG)	V (Peak 1)	V (Peak 2)	V (Peak 3)
PEG-4k85-PMAS	60 %	23 %	13 %	
PEG-4k70-PMAS	55 %	28 %	9 %	6 %
	M _w (PEG)	M _w (1)	M _w (2)	M _w (3)
PEG-4k85-PMAS	2.700	27.600	7.200	
PEG-4k70-PMAS	2.600	36.700	10.200	6.200

Die Konturplots der anderen Copolymere entsprechen in ihrer Form denen aus Abb. 4.25 und Abb. 4.27, sie unterscheiden sich lediglich in der Lage und Intensität der Peaks.

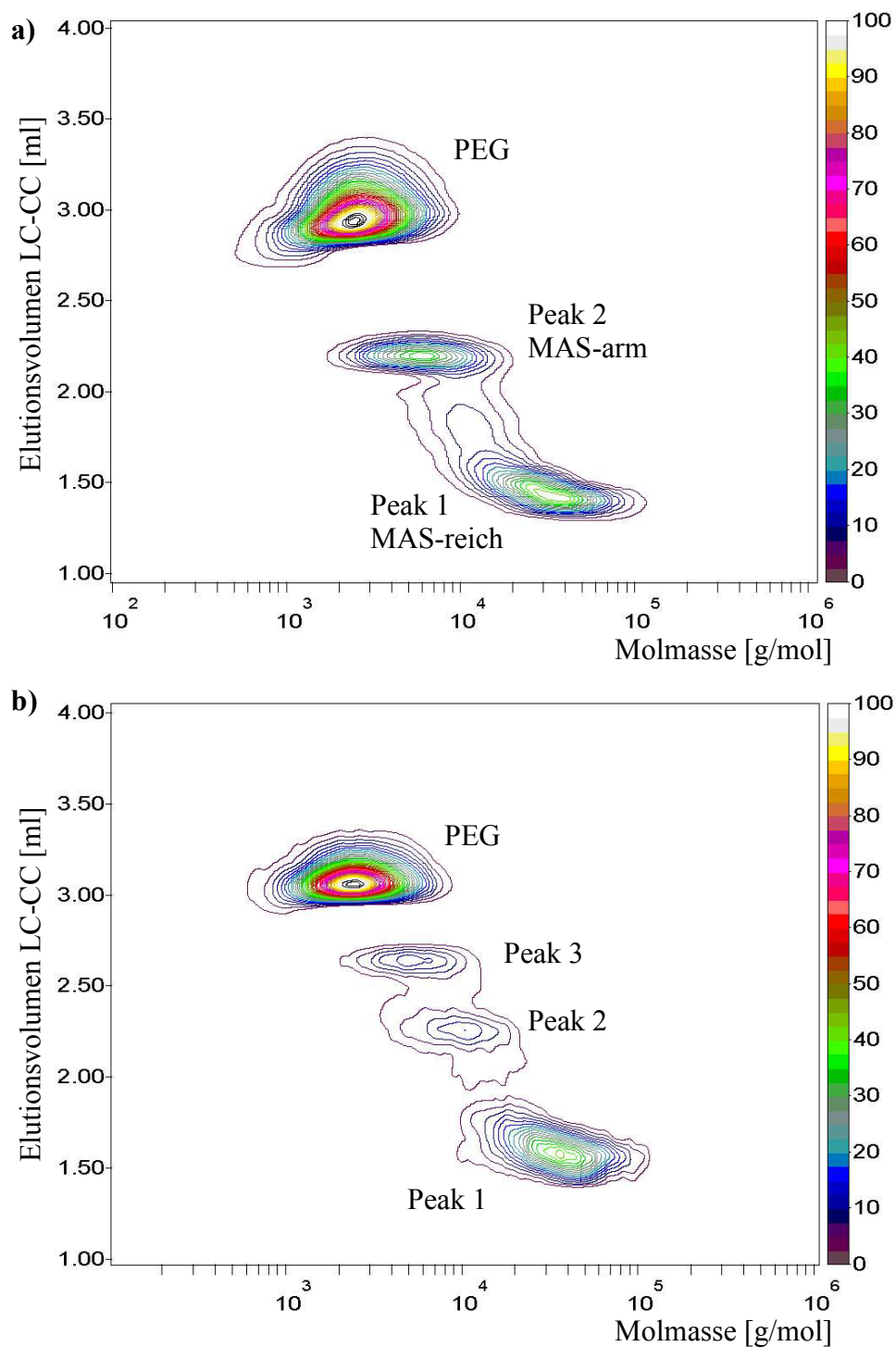


Abb. 4.27: 2D Konturplots von PEG-4k85-PMAS (a) und PEG-4k70-PMAS (b); LC-CC (erste Dimension): stationäre Phase: Nucleosil 100 RP 18 (250 x 4,6 mm i.d.), mobile Phase: Methanol/Wasser 81/19 (w/w), Flussrate: 0,042 ml/min; SEC (zweite Dimension): stationäre Phase: Suprema linear M, High-Speed (50 x 20 mm i.d.), mobile Phase: 0,02 M Ammoniumacetat in Wasser, Flussrate: 2,5 ml/min; Injektion alle 2,4 min, Gesamtanalysendauer: 120 min (bei 100 µL Probenschleife = 50 Injektionen)

4.1.4.2 PMAS-g-PEG-Copolymere

Die 2D-Chromatographie wurde auch für die Charakterisierung von PMAS-g-PEG eingesetzt. Abb. 4.28 zeigt den Konturplot einer entsprechenden Messung für PMAS-30-MPEG-MM. Analog zu den Ergebnissen der LC-FTIR-Kopplung ist die Probe sehr einheitlich aufgebaut. Die leicht gestreckte Form des Konturplots gibt lediglich wieder, dass kein Produkt mit einheitlicher Länge des Rückgrates vorliegt, sondern eine Kettenlängenverteilung.

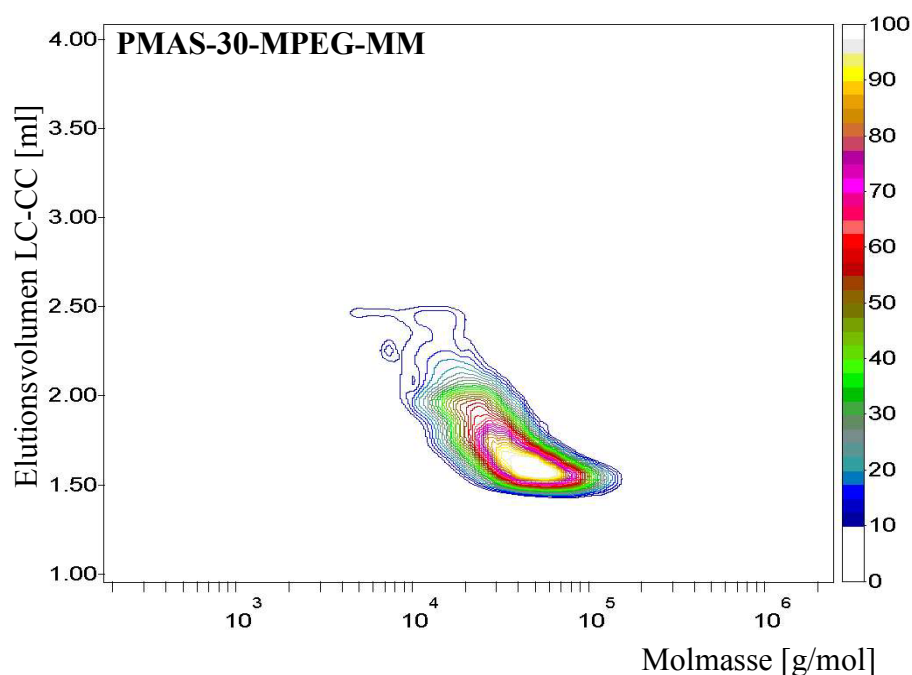


Abb. 4.28: 2D Konturplots von PMAS-0-MPEG-MM und PMAS-30-MPEG-MM; chromatographische Bedingungen wie in Abb. 4.27

4.2 Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung von verzweigten PEG-g-PVOH- und PEG-g-PVAc-Copolymeren

Neben der Methodenentwicklung für die ionischen Copolymere PEG-g-PMAS und PMAS-g-PEG wurden auch chromatographische Methoden für nicht ionische hydrophile Copolymersysteme entwickelt. Dies waren PEG-g-PVOH-Pfropfcopolymere, die durch Pfropfung von Vinylacetat (VAc) auf PEG und eine anschließende Hydrolyse des Vinylacetates zum Vinylalkohol (VOH) als Modellsysteme hergestellt wurden.

Die Pfropfreaktion sowie die polymeranaloge Umsetzung von PEG-g-PVAc zu PEG-g-PVOH verlaufen nicht vollständig, weshalb bereits herstellungsbedingt verschiedene Produktverteilungen zu erwarten sind (Abb. 4.29).

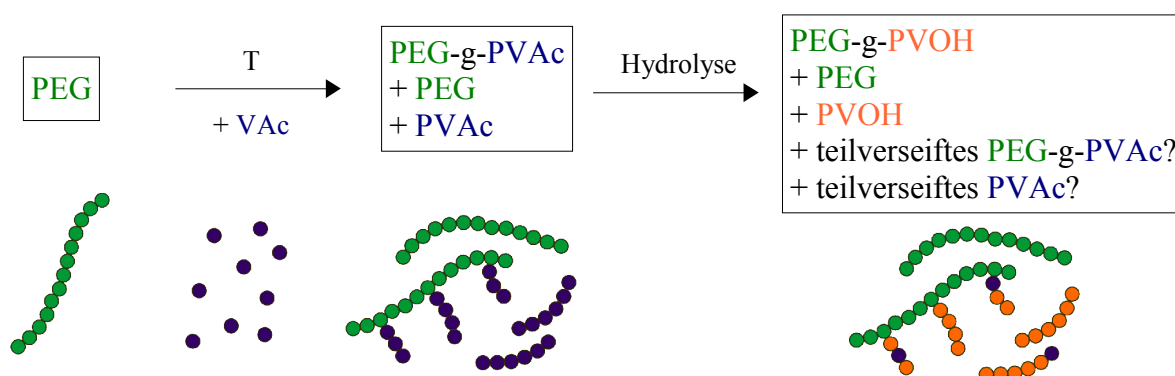


Abb. 4.29: Produktgemisch aus der Synthese von PEG-g-PVOH

Neben den PEG-g-PVOH-Copolymeren wurden auch deren Edukte, die PEG-g-PVAc-Copolymere untersucht. Die Methodenentwicklung wurde zunächst an einem hochmolekularen Probenpaar durchgeführt, das durch Pfropfung von PEG mit einer Molmasse von 35.000 g/mol (PEG 35k) hergestellt wurde. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde dann noch eine niedermolekulare Probenserie hinzugenommen, bei der die Pfropfung mit drei verschiedenen PEGs und in unterschiedlichen Eduktverhältnissen erfolgte. Die Nomenklatur wurde so gewählt, dass daraus das Molekulargewicht des eingesetzten PEGs und sein Massenanteil im Eduktgemisch hervorgeht. Der Zusatz des Buchstabens u (unsaponified) bzw. s (saponified) macht kenntlich, ob es sich um das PVAc-Copolymere oder seine verseifte Variante (PEG-g-PVOH) handelt. 35k40u ist also PEG-g-PVAc, das aus einem PEG 35k in einem Verhältnis von PEG/VAc 40:60 hergestellt wurde. 35k40s ist dementsprechend das daraus durch Hydrolyse gewonnene PEG-g-PVOH. Der Gewichtsanteil bezieht sich immer auf das eingesetzte Verhältnis von PEG zu VAc und nicht auf das Bruttoproductverhältnis von PEG zu PVOH, was in diesem Fall bei vollständiger Umsetzung 60:40

betragen würde. Eine Übersicht über die Produkte der niedermolekularen Modellserie ist in Tab. 4.6 aufgeführt.

Tab. 4.6: Überblick über die PEG-g-PVOH- (PEG-g-PVAc-) Copolymere

M(PEG) Gew.% PEG	1,5k	6k	12k
15	1,5k15s (u)	6k15s (u)	12k15s (u)
50	1,5k50s (u)	6k50s (u)	12k50s (u)
85	1,5k85s (u)	6k85s (u)	12k85s (u)

Das PEG 35k wurde vor der Pfropfung bei 80 °C über einen Zeitraum von 16 Stunden aufgeschmolzen. Um abzuschätzen, ob dadurch bereits eine Veränderung des Eduktes stattfindet, wurde neben den Copolymeren auch bei unterschiedlichen Temperaturen (80, 100, 120 °C) getempertes PEG 35k untersucht.

4.2.1 Wässrige Größenausschlusschromatographie

Die wässrige Größenausschlusschromatographie für die PEG-g-PVOH-Copolymere wurde zunächst mit der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Methode mit hoher Salzkonzentration (NaCl + TRIS) und RI-Detektion durchgeführt. Die SEC-Elugramme des bei unterschiedlich hohen Temperaturen aufgeschmolzenen PEG 35k sind in Abb. 4.30a dargestellt. Dabei wird deutlich, dass das PEG durch den Temperatureinfluss eine Veränderung seiner Molmassenverteilung erfährt. Während das unbehandelte PEG in einem schmalen Peak eluiert, tritt mit steigenden Temperaturen ein Tailing zu hohen Elutionsvolumina hin auf. Demzufolge findet ein partieller Molmassenabbau statt. Die M_w -Werte sinken dabei von 35.000 g/mol auf 25.000 g/mol bei einem gleichzeitigen Anstieg der Polydispersität von 1,2 auf 3,3. Dieser Überlagerung ist in Abb. 4.30b das Elugramm des Copolymers 35k40s mit einer Überlagerung des bei 120°C getemperten PEG gegenübergestellt.

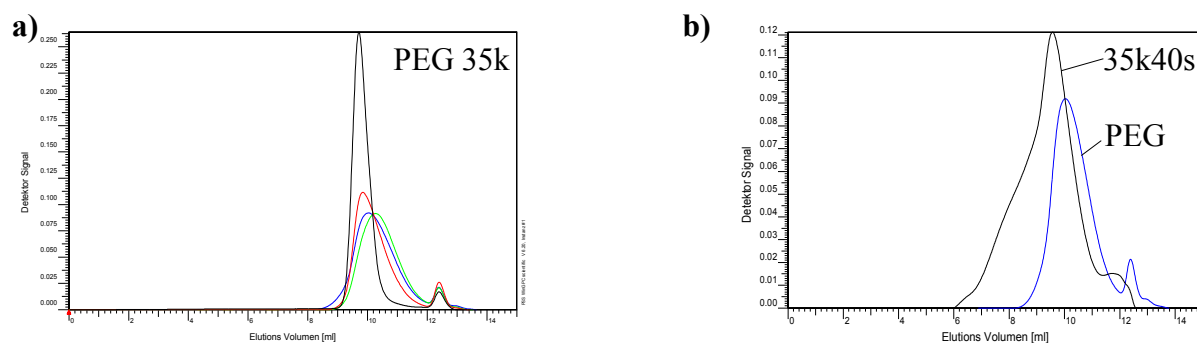


Abb. 4.30: SEC-Elugramme von a) PEG 35k, nicht getempert (schwarz) sowie bei 80 °C (rot), 100 °C (grün) und 120 °C (blau) getempert und b) von 35k40s; mobile Phase: Wasser, TRIS 0,08 M, NaCl 0,15 M, NaN_3 0,01 M, pH 7; stationäre Phase: Suprema linear M; Detektor: RI

35k40s eluiert früher als das bei 120 °C getemperte Edukt PEG 35k und weist zusätzlich eine Schulter und ein Tailing bei niedrigen Elutionsvolumina auf. Eine Unterscheidung zwischen nicht umgesetztem Edukt und dem Produkt ist mithilfe der wässrigen SEC nicht möglich, das heißt, es kann weder eine Aussage darüber getroffen werden, ob und in welcher Menge ungepfropft PEG enthalten ist, noch darüber, welche Molmasse das Pfropfprodukt hat. Eine Fraktionierung und anschließende Untersuchung mittels FTIR wurde durch den Salzgehalt des Eluenten gestört und konnte nicht ausgewertet werden.

Parallel wurde auch die unverseifte Probe 35k40u mit einer konventionellen THF-SEC untersucht. Das entsprechende Elugramm ist in Abb. 4.31 dargestellt. Da der Eluent salzfrei ist, konnte hier eine Fraktionierung der Probe mit anschließender Untersuchung durch FTIR durchgeführt werden. Durch einen Vergleich der für PEG und PVAc spezifischen Banden bei 1100 cm^{-1} (EO) bzw. 1735 cm^{-1} (VAc Carbonylbande) konnte nachgewiesen werden, dass alle Fraktionen sowohl EO als auch VAc enthalten. Die Probenkonzentrationen und die Qualität der Spektren der einzelnen Fraktionen waren jedoch zu gering, um eine Aussage über die Verteilung der Comonomere zu treffen. Da PEG 35 k in THF schlecht löslich ist, wurde darauf verzichtet, vergleichende SEC-Messungen mit diesem Edukt durchzuführen.

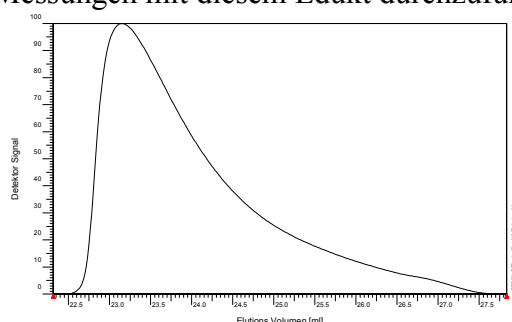


Abb. 4.31: SEC-Elugramm von 35k40u; mobile Phase: THF, stationäre Phase: Waters Linear, PL Gel Mixed-C, PL Gel Mixed-D, Detektor: RI

Im Weiteren wurde die Modellserie der PEG-g-PVOH Copolymere durch wässrige SEC untersucht. Die Messungen erfolgten in zwei unterschiedlichen mobilen Phasen. Die optimierte Methode ist die bereits in Kapitel 4.1.4 beschriebene SEC mit einem verdampfbaren Salz (Ammoniumacetat) im Eluent, wodurch die Detektion mit einem ELSD möglich wird. Der Vorteil des ELSD gegenüber einer RI-Detektion liegt bei niedermolekularen Proben darin, dass das Detektorsignal nicht durch das Lösemittelsignal gestört wird. In Abb. 4.32 sind die Elugramme der PEG-g-PVOH- bzw. PEG-g-PVAc-Copolymere ihrer jeweiligen Pfropfgrundlage überlagert.

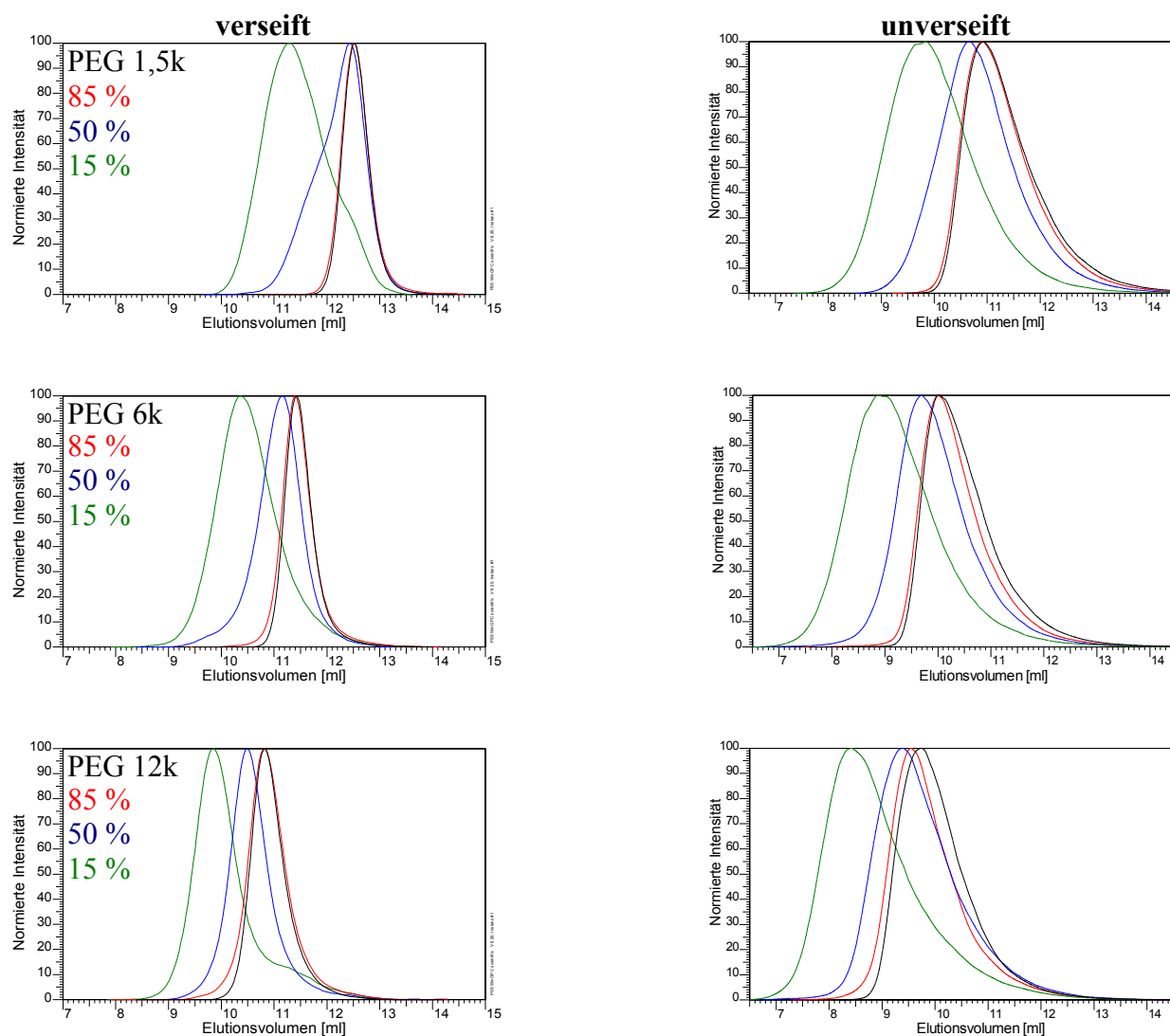


Abb. 4.32: Überlagerung der SEC-Elugramme aus der PEG-g-PVOH und PEG-g-PVAc Serie mit den Ausgangs-PEGs (schwarz) und 85 % (rot), 50 % (blau) sowie 15 % (grün) Gewichtsanteil PEG; mobile Phase: 0,02 M Ammoniumacetat in Wasser, stationäre Phase: PSS Suprema linear M (300 x 8 mm) bzw. PSS SDV 10⁴ (50 x 20 mm), Detektor: ELSD

Bei hohen PEG-Anteilen (85 %) liegt noch eine weitgehende Ähnlichkeit der Elutionsform mit dem Precursor vor, und es wird keine signifikante Molmassenerhöhung festgestellt. Mit geringerem PEG-Anteil in der Reaktionsmischung tritt jedoch eine Verschiebung des Peakmaximums zu niedrigen Elutionsvolumina sowie eine Peakverbreiterung auf. Dies zeigt die Bildung von höhermolekularen Copolymeren an. Die Copolymere mit dem geringsten PEG-Gehalt weisen zusätzlich eine Schulter bzw. ein deutliches Tailing im Bereich des Elutionsvolumens des eingesetzten PEGs auf.

4.2.2 Chromatographie am kritischen Punkt von PEG

Über die SEC konnten nur Bruttoinformationen über die Molmassenverteilung der gesamten Reaktionsprodukte erhalten werden. In einem weiteren Schritt sollte nun durch die Chromatographie am kritischen Punkt von PEG eine Auftrennung in die PEG-Homopolymere und die Copolymere erfolgen. Abb. 4.33 zeigt die Elugramme der Edukte sowie des PEG-g-PVAc und des PEG-g-PVOH Copolymers für die Pfropfung von PEG 35k.

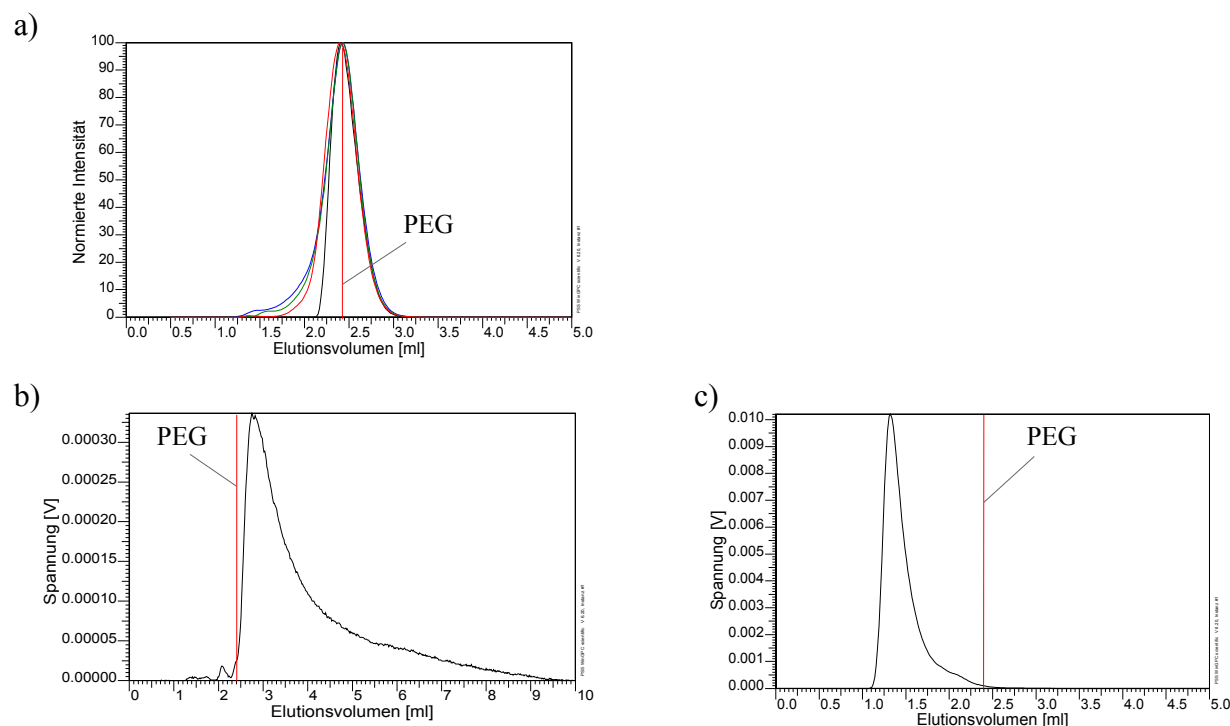


Abb. 4.33: LC-CC-Elugramme von a) PEG 35k, nicht getempert (schwarz) sowie bei 80 °C (rot), 100 °C (grün) und 120 °C (blau) getempert, sowie b) 35k40u und c) 35k40s; stationäre Phase: Knauer Nucleosil RP18-100, mobile Phase: Methanol/Wasser 81/19 (w/w), Flussrate: 1 ml/min, Detektor: ELSD

Während die SEC gezeigt hat, dass durch die thermische Behandlung des PEG 35k ein deutlicher Molmassenabbau stattfindet, tritt in der Chromatographie am kritischen Punkt von PEG keine starke Veränderung der Elutionsprofile für die unterschiedlich beanspruchten PEGs auf (Abb. 4.33a). Ein leichtes Tailing bei niedrigen Elutionsvolumina zeigt, dass zu einem geringen Anteil zusätzliche polare funktionelle Gruppen entstanden sind. Die thermische Behandlung von PEG 35k hat somit eine Depolymerisation bei nur geringer Änderung der chemischen Zusammensetzung zur Folge.

Entsprechend der abnehmenden Polarität PVOH > PEG > PVAc eluiert 35k40u auf der unpolaren stationären Phase später als das PEG (Abb. 4.33b). Durch starke Adsorptionseffekte weist das Elugramm ein starkes Tailing auf. Es ist kein homopolymeres PEG in mit dieser Methode nachweisbarer Konzentration enthalten. Aufgrund der starken Adsorption sollen weitere

Untersuchungen an PEG-g-PVAc nicht am kritischen Punkt von PEG, sondern mit anderen HPLC-Methoden durchgeführt werden.

35k40s eluiert entsprechend seiner Polarität bei 1,4 ml und somit früher als PEG (Abb. 4.33b). Die Elution erfolgt gleichmäßig und in einem Peak, jedoch mit einem Tailing, das in den Elutionsbereich von reinem PEG hineinreicht. Das Elugramm gibt keinen Hinweis darauf, ob geringe Mengen nicht umgesetztes PEG enthalten sind.

In Abb. 4.34 sind die LC-CC-Elugramme der Ausgangs-PEGs denen der Modellserie von PEG-g-PVOH gegenübergestellt. Anhand der Elugramme kann gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der gebildeten Produkte stark von der Molmasse der Edukte sowie von den eingesetzten Massenverhältnissen abhängt.

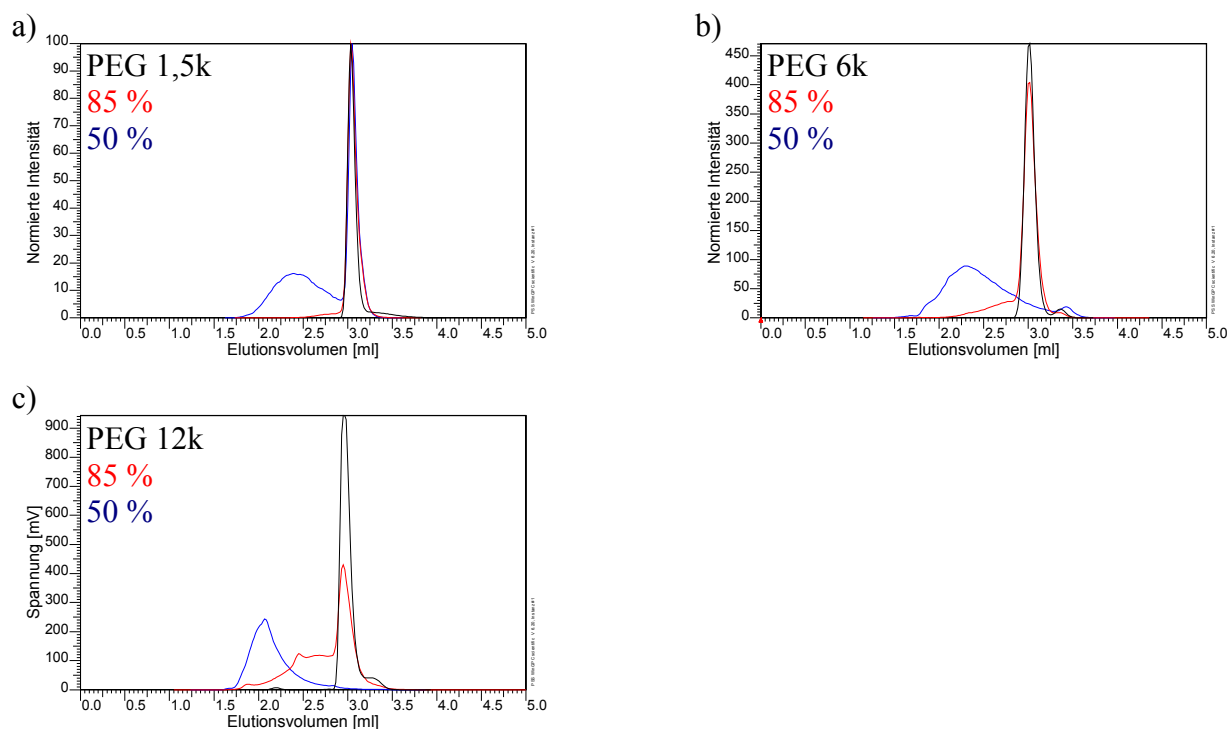


Abb. 4.34: LC-CC-Elugramme am kritischen Punkt von PEG für die PEG-g-PVOH-Copolymere aus a) PEG 1,5k, b) PEG 6k und c) PEG 12k mit dem Ausgangs-PEGs (schwarz) sowie 85 % (rot) und 50 % (blau) Gewichtsanteil PEG; stationäre Phase: Macherey-Nagel EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18, mobile Phase: Methanol/Wasser 82,5/17,5 (v/v), Flussrate: 1 ml/min, Detektor: ELSD

Während das Produkt 1,5k85s weitgehend wie sein Edukt bei 3 ml eluiert, weist 1,5k50s bereits einen deutlichen Anteil (48 %) eines bei niedrigeren Elutionsvolumina eluierenden Probenbestandteils auf. Der gleiche Trend ist auch bei den Copolymeren aus PEG 6k und PEG 12 k zu beobachten. Die Copolymeranteile betragen 15 % und 82 % (6k-Copolymere) bzw. 47 % und 97 % (12k-Copolymere). Diese Werte zeigen weiterhin, dass nicht nur die relativen Anteile von EO- zu VOH-Einheiten, sondern auch die Kettenlängen der eingesetzten PEGs einen großen

Einfluss auf das chromatographische Verhalten der Pfropfprodukte haben. Wenn wenige lange Ketten als Edukte vorliegen, so ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass jede Kette ein- oder mehrmals gepfropft wird als bei vielen kurzen Ketten. Für Produkte aus einem PEG mittlerer Molmasse (6k) und geringem PEG-Anteil ist somit eine vollständige Umsetzung des PEG zu erwarten.

4.2.3 Chromatographie am kritischen Punkt von PVAc

In Abb. 4.33c wurde gezeigt, dass sich die Chromatographie am kritischen Punkt von PEG wegen der starken Adsorptionseffekte für PEG-g-PVAc nicht eignet. Zudem soll untersucht werden, ob bei der Pfropfung zusätzlich homopolymeres PVAc gebildet wurde. Diese Information kann durch die Chromatographie am kritischen Punkt von PVAc erhalten werden. Ausgehend von einer Gradientenmethode^[61] für die Trennung von PVAc und PVOH wurde für die Methodenentwicklung der LC-CC ein Lösemittelgemisch aus THF und Wasser gewählt. Ziel dieser zusätzlichen Messungen war, neben der Bestimmung von PVAc im Produktgemisch eine Methode für eine spätere Kopplung zu erarbeiten. Als stationäre Phase wurde eine RP-18-Säule ausgewählt, damit polare PEG-Copolymere im SEC-Modus vor reinem PVAc eluieren.

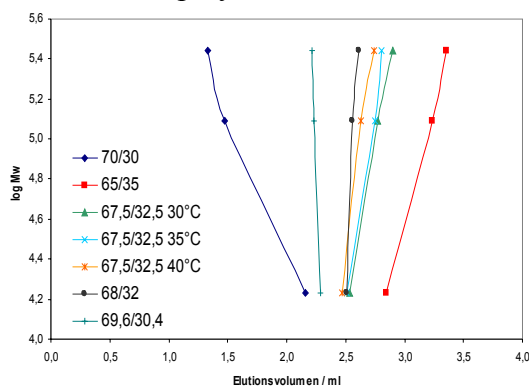


Abb. 4.35: Bestimmung der kritischen Bedingungen für PVAc, Säule: Knauer Nucleosil 100, C18, 250 x 4 mm, mobile Phase: THF/Wasser (w/w)

Das chromatographische Verhalten von PVAc bei unterschiedlichen Eluentenzusammensetzungen und unterschiedlichen Temperaturen ist in einem sogenannten „kritischen Diagramm“ in Abb. 4.35 dargestellt. Erwartungsgemäß eluiert PVAc bei hohen THF-Anteilen im SEC-Modus. Der kritische Punkt der Adsorption wird bei einer Zusammensetzung der mobilen Phase von THF-Wasser 69,6:30,4 Gew.% (entspricht 72:28 Vol.%) gefunden. Das Elutionsvolumen für PVAc liegt bei 2,3 ml.

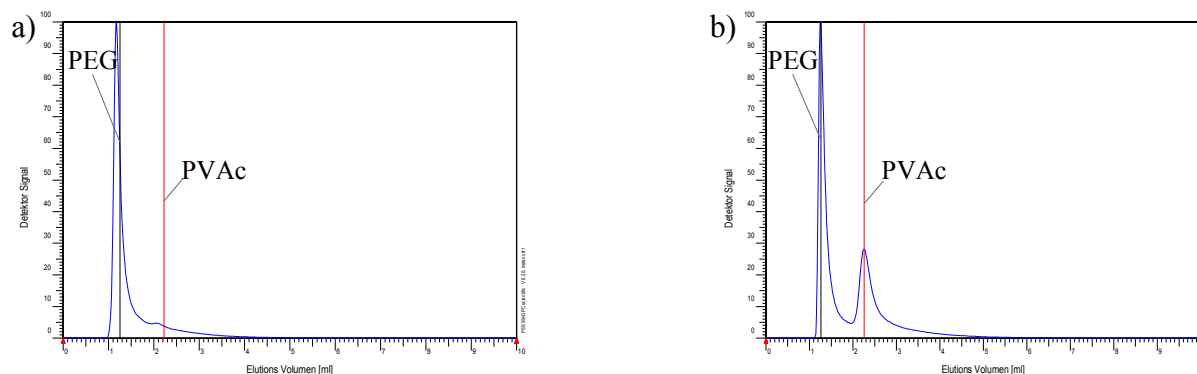


Abb. 4.36: LC-CC-Elugramme am kritischen Punkt von PVAc für a) 35k40u und b) ein Blend aus PEG und PVAc; stationäre Phase: Knauer Nucleosil RP18-100, mobile Phase: THF/Wasser 72:28 (v/v), Flussrate: 1 ml/min, Detektor: ELSD

Das Elugramm des Pfropfcopolymers 35k40u (Abb. 4.36a) weist unter diesen Bedingungen einen Peak mit einer Schulter auf. Die Schulter wird durch einen Vergleich mit dem Elugramm eines Blends aus PEG und PVAc (Abb. 4.36b) als PVAc identifiziert. In der Abbildung ist das entsprechende Elutionsvolumen durch eine rote Linie kenntlich gemacht. Erwartungsgemäß verhält sich das Produkt chromatographisch ähnlich wie reines PEG, da die zweite Komponente (PVAc) durch die kritischen Bedingungen chromatographisch „ausgeblendet“ wurde.

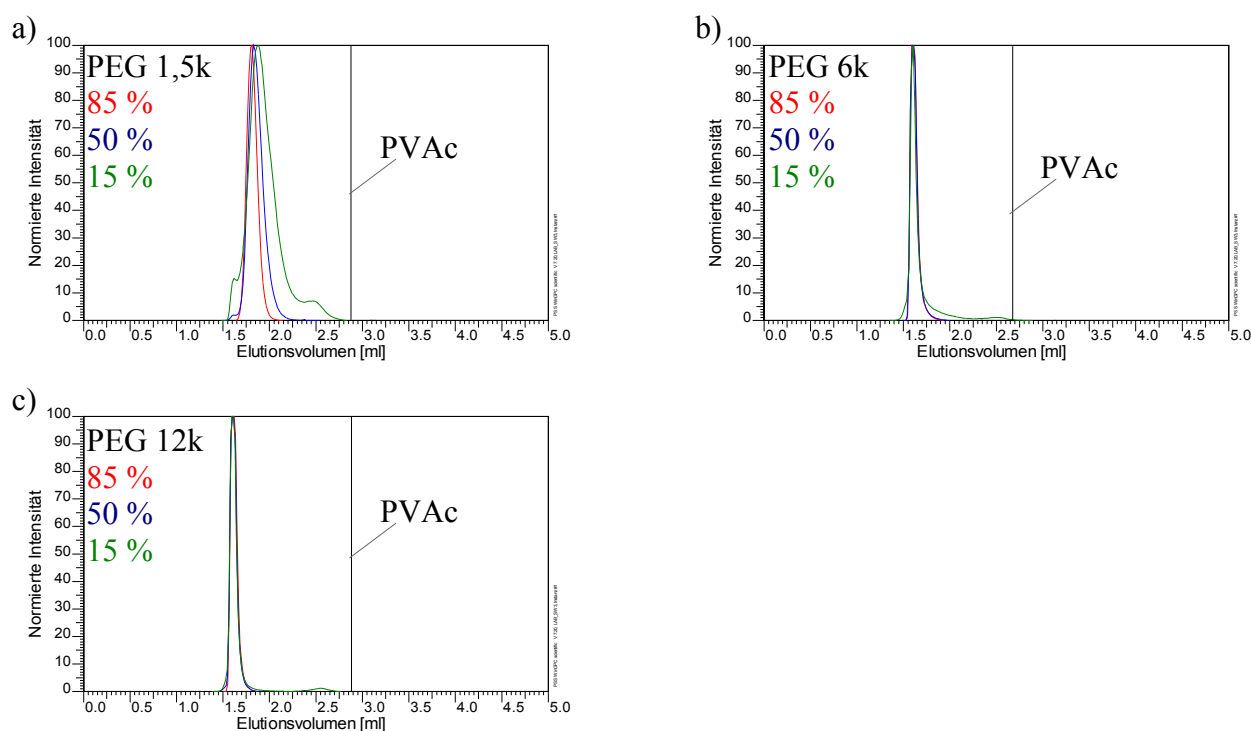


Abb. 4.37: LC-CC-Elugramme am kritischen Punkt von PVAc für die PEG-g-PVAc Copolymere aus a) PEG 1,5k, b) PEG 6k und c) PEG 12k mit 85 % (rot) , 50 % (blau) und 15 % (grün) Gewichtsanteil PEG; stationäre Phase: Macherey-Nagel EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18, mobile Phase: THF/Wasser 73,3:26,7 (v/v), Flussrate: 1 ml/min, Detektor: ELSD

Auch für die LC-CC-Elugramme der PEG-g-PVAc-Serie sollte gelten, dass sich die Copolymere chromatographisch ähnlich verhalten wie PEG. In Abb. 4.37 sind die entsprechenden Überlagerungen abgebildet. Für die Pfropfung von PEG 12 k (Abb. 4.37c) wird diese Erwartung erfüllt. Auch bei einem geringen PEG-Anteil von 15 % eluiert das Produkt wie reines PEG. Lediglich ein kleines Signal bei einem Elutionsvolumen von 1,7 ml lässt auf geringe Anteile an PVAc im Produkt schließen. In Abb. 4.37b wird das gleiche Verhalten beobachtet. Die Elugramme der Pfropfprodukte aus PEG 1,5 k (Abb. 4.37a) unterscheiden sich jedoch durch eine breitere Peakform für 1,5k85u und 1,5k50u sowie zusätzliche Schultern bei 1,5k15u von reinem PEG. Diese Beobachtung stimmt mit den Aussagen von Guttman, Di Marzio und Douglas zur Gültigkeit von kritischen Bedingungen für Kammcopolymere überein.^[96] Danach sind für Kammcopolymere vom Typ $A_{nA}B_{nB}$ mit dem Rückgrat A und Seitenketten B die kritischen Bedingungen des Homopolymers A auch für das Kammcopolymer gegeben, wenn das Rückgrat lang ist im Vergleich zur Anzahl und Länge der Seitenketten. Abb. 4.38 veranschaulicht schematisch, wie sich die Struktur des Kammcopolymers mit abnehmender Länge des Rückgrats verändert.

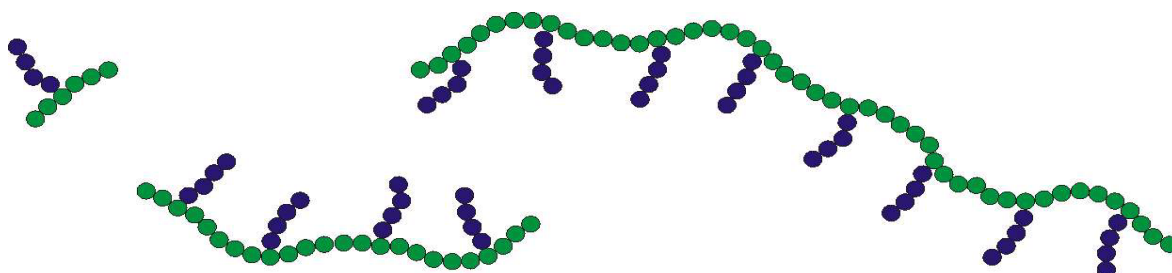


Abb. 4.38: Vergleich der Molekülstruktur für Kammcopolymere mit unterschiedlich langem Rückgrat bei gleichem Seitenkettenanteil

Mit zunehmendem PVAc-Anteil steigt auch die Anzahl der Pfropfäste und somit eine Veränderung der chemischen Struktur des Rückgrates an der Pfropfstelle, wodurch dieses selbst bei „Ausblenden“ des VAc-Anteils ein anderes Elutionsverhalten zeigt als reines PEG. Diese Effekte sind bei den Pfropfprodukten von PEG 1,5 k am größten. Bei 1,5k15u äußert sich dies durch eine starke Peakverbreiterung sowie eine zusätzliche Schulter bei niedrigem Elutionsvolumen. In diesem Produkt ist zusätzlich ein Anteil von PVAc im Prozentbereich (ca. 5 %) nachzuweisen.

4.2.4 Gradientenchromatographie

Mit den vorgestellten Methoden der Chromatographie am kritischen Punkt von PEG bzw. PVAc ist jeweils der Nachweis der entsprechenden Homopolymere möglich. Durch die großen Polaritätsunterschiede von PEG-g-PVOH und PEG-g-PVAc kann kein direkter Vergleich dieser beiden Copolymere mit derselben Methode durchgeführt werden. Um nun beide Spezies mit einer HPLC-Methode untersuchen zu können, wurde die Gradientenchromatographie eingesetzt. In Anlehnung an eine von Dawkins et al.^[61] vorgeschlagene Methode wurde nach Optimierung der chromatographischen Bedingungen (Lösemittelzusammensetzung, Steigung des Gradienten) zunächst unterschiedlich stark verseiftes PVAc untersucht, um zu zeigen, dass eine Trennung nach der chemischen Zusammensetzung erzielt werden kann. Abb. 4.39 zeigt eine Überlagerung der Elugramme von PVOH, PVAc und verschiedenen teilverseiften PVAc unter Gradientenbedingungen sowie den Gradientenverlauf.

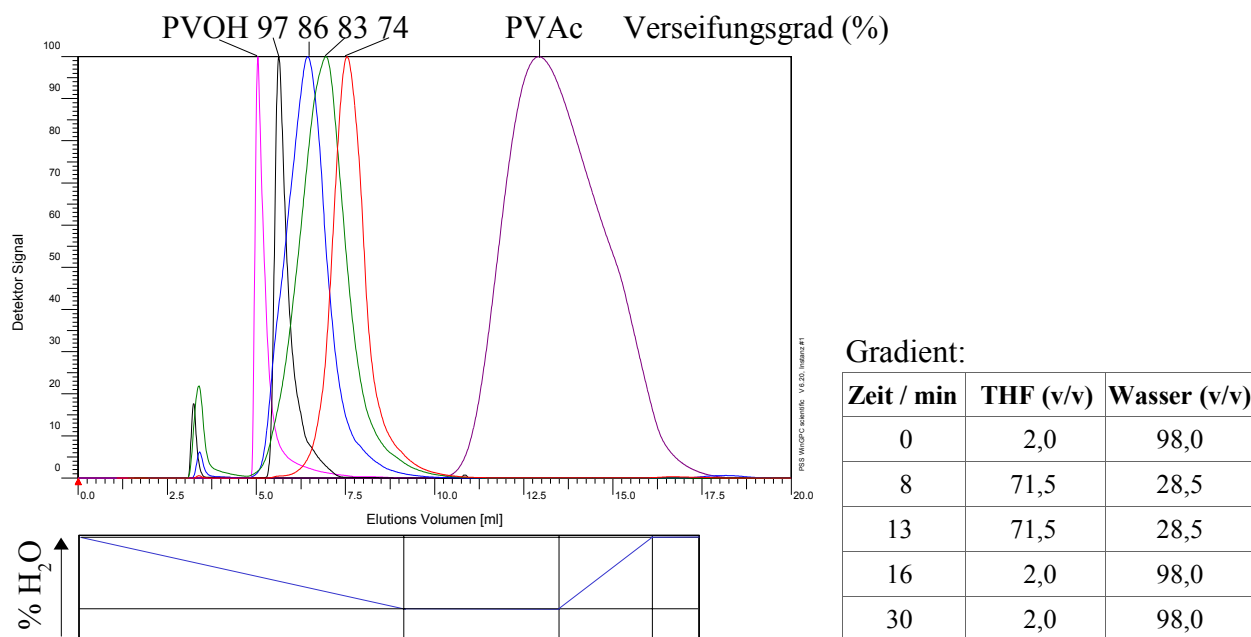


Abb. 4.39: Elugramme unter Gradientenbedingungen; stationäre Phase: Knauer Nucleosil RP18-100; Flussrate: 1 ml/min, Detektor: ELSD

Zum besseren Vergleich des Elutionsverhaltens von 35k40s und 35k40u sind die entsprechenden Elugramme in Abb. 4.40 denen von PVOH und PVAc überlagert. Die Copolymere weisen jeweils eine Schulter auf, die dem Elutionsvolumen von PVOH bzw. PEG entspricht. Die Intensitäten sind jedoch so gering, dass das Vorliegen von Homopolymeren nicht eindeutig verifiziert werden kann.

Die bisher vorgestellten Methoden bieten jeweils nur eine Teilinformation über die Produkte der Pfropfreaktion. Dies sind zum Beispiel Angaben über vorliegende Homopolymere, teilweise auch

über die Anzahl und den Anteil an Copolymeren. Eine Übersicht darüber, welche Aussagen anhand der einzelnen chromatographischen Methoden über das System PEG-g-PVOH bzw. PEG-g-PVAc getroffen werden können, ist in Abb. 4.41 schematisch dargestellt.

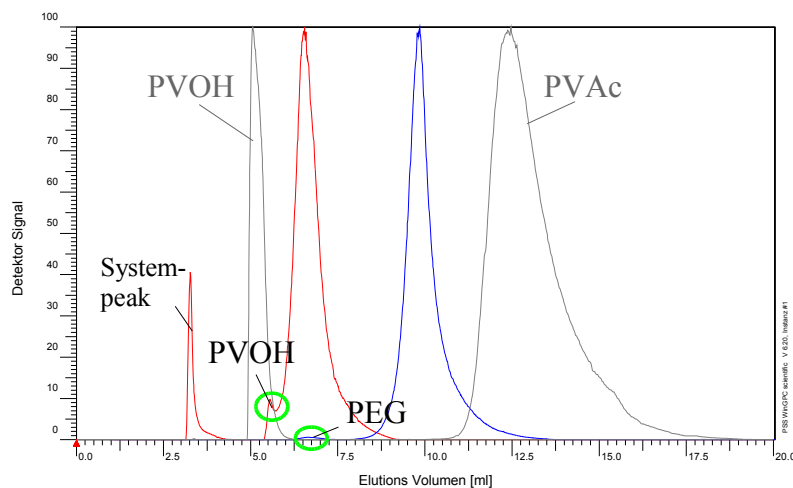


Abb. 4.40: Überlagerung 35k40s (rot) und 35k40u (blau) unter Gradientenbedingungen; chromatographische Bedingungen siehe Abb. 4.39

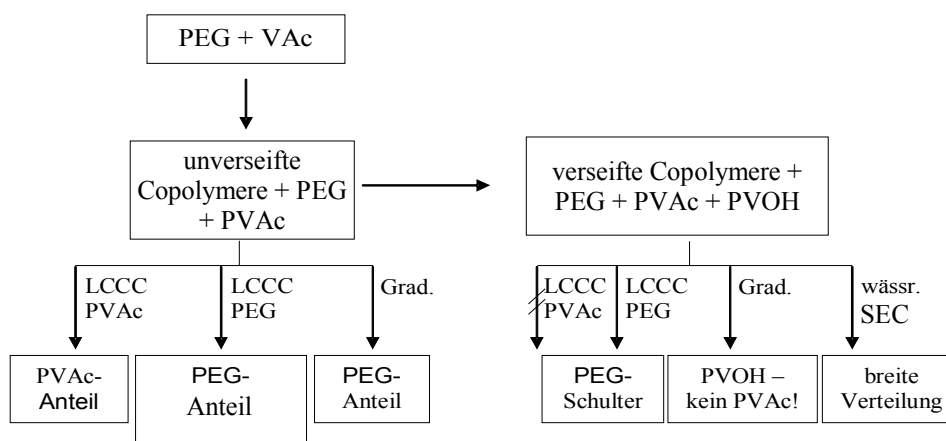


Abb. 4.41: Informationsgehalt verschiedener chromatographischer Methoden bei der Analyse von PEG-g-PVOH und PEG-g-PVAc

4.2.5 LC-FTIR-Kopplung

Bisher wurde gezeigt, dass mit verschiedenen chromatographischen Einzelmethodeen jeweils unterschiedliche Informationen über das gegebene System gewonnen werden können. Dabei wurde in der HPLC die Zuordnung der Signale im Elugramm anhand des Vergleiches der Elutionsvolumina mit den Homopolymeren PEG, PVAc und PVOH, sowie durch Abschätzen der Polarität getroffen. Die bereits in Kapitel 4.1.3 beschriebene online-Kopplung der Flüssigchromatographie mit der FTIR bietet auch hier die Möglichkeit, Aussagen über die chemische Zusammensetzung der Probe zu treffen. Da sich die IR-Spektren von EO und VOH

jedoch ähneln, kann zur Auswertung der EO-Anteile nicht wie bei den EO/MAS-Copolymeren die intensive Bande bei 1100 cm^{-1} verwendet werden. Für die Analyse von EO/VOH-Copolymeren ist die schwächere Bande bei 950 cm^{-1} für EO besser geeignet. Für VOH wird die OH-Bande bei 3360 cm^{-1} ausgewertet. Exemplarisch sollen hier zwei Analysenbeispiele aus der PEG-g-PVOH-Serie gezeigt werden. In Abb. 4.42 ist für 12k50s sowohl die Wasserfalldarstellung als auch die Gram-Schmidt-Rekonstruktion für die FTIR-Kopplung mit der LC-CC von PEG dargestellt. Der eingezeichnete PEG-Anteil zeigt, dass zunächst ein PEG-armes und dann ein PEG-reicheres Produkt eluiert. Dieser Übergang scheint sprunghaft aufzutreten, d.h. es sind wahrscheinlich zwei Produkte unterschiedlicher Zusammensetzung in der Probe enthalten. Diese Information ist aus der LC-CC allein nicht ersichtlich, sondern nur durch die LC-FTIR-Analyse zugänglich. Das Elugramm aus der LC-CC (Gram-Schmidt-Darstellung) lässt ein einheitliches Produkt erwarten.

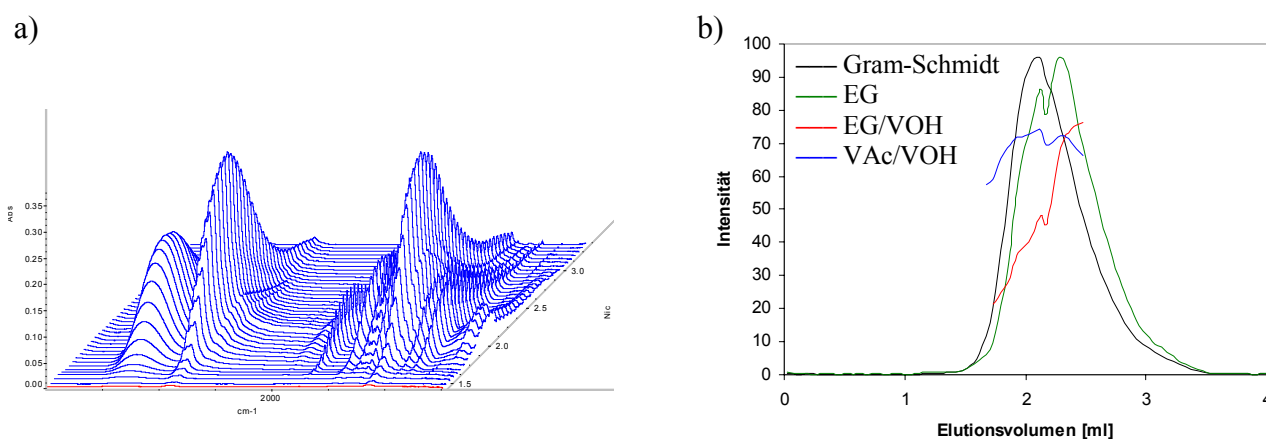


Abb. 4.42: LC-FTIR-Kopplung von 12k50s unter kritischen Bedingungen für PEG: a) Wasserfalldarstellung, b) Gram-Schmidt-Rekonstruktion; chromatographische Bedingungen: stationäre Phase: Macherey-Nagel EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18, mobile Phase: Methanol/Wasser 82,5/17,5 (v/v), Flussrate: 1 ml/min, Detektor: ELSD

Zusätzlich wurde überprüft, inwiefern auch der Verseifungsgrad der Probe abgeschätzt werden kann. Die Hydrolyse von PVAc verläuft meistens nicht vollständig, d.h. es können jeweils noch einige Prozent Acetat im Produkt enthalten sein. Über die Esterbande bei 1735 cm^{-1} kann dieses leicht nachgewiesen werden. Sowohl in Abb. 4.42 als auch in Abb. 4.43 wird der Estergehalt durch das Bandenverhältnis von VOH zu VAc erfasst. Es ist interessant, dass der Verseifungsgrad im Produkt nicht konstant ist, sondern tendentiell bei den Copolymeren mit dem größeren VOH-Anteil (niedrige Elutionsvolumina) am größten erscheint. Zusätzlich zu der Trennung in der LC-CC werden mit der FTIR-online-Kopplung gleichzeitig mehrere wichtige Informationen über die Zusammensetzung erhalten, die durch chromatographische Methoden allein nicht zugänglich sind.

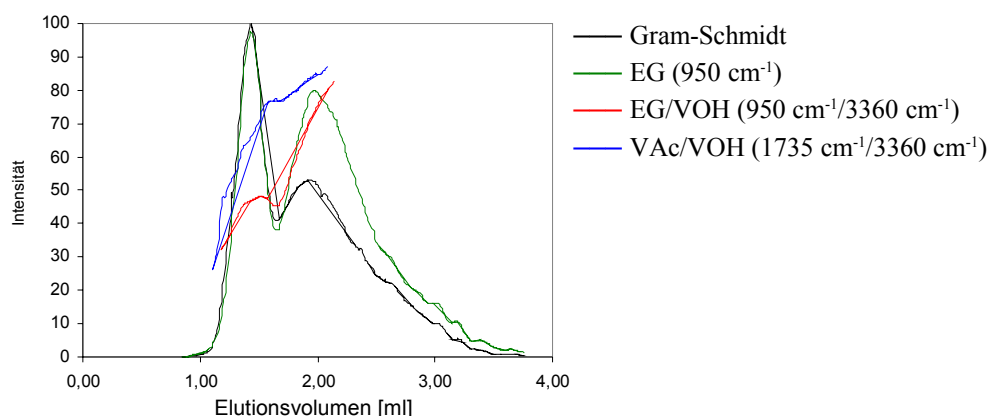


Abb. 4.43: Gram-Schmidt-Darstellung der LC-FTIR-Kopplung von 6k15s unter kritischen Bedingungen für PEG; chromatographische Bedingungen: stationäre Phase: Macherey-Nagel EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18, mobile Phase: Methanol/Wasser 82,5/17,5 (v/v), Flussrate: 1 ml/min, Detektor: ELSD

4.2.6 Zweidimensionale Flüssigchromatographie

Für das Copolymer 6k15s soll exemplarisch gezeigt werden, welche Informationen durch die Kopplung der LC-CC (PEG) mit der wässrigen SEC erhalten werden können. Abb. 4.44 zeigt, dass die SEC allein eine einheitliche Substanz vermuten lässt.

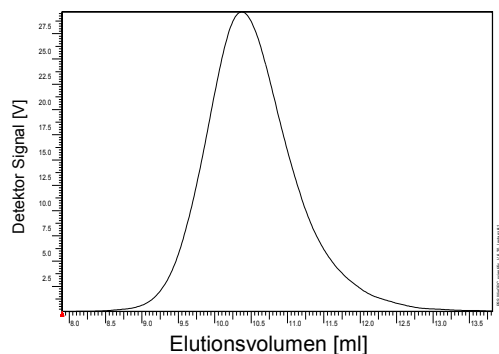


Abb. 4.44: SEC-Eluogramm von 6k15s; chromatographische Bedingungen siehe Abb. 4.32

Erst die Konturplots in Abb. 4.45 geben eine Möglichkeit zur Strukturaufklärung und zur Bestimmung der Molmassen für die beiden gebildeten Produkte. Zusätzlich kann nachgewiesen werden, dass kein homopolymeres PEG in nachweisbaren Konzentrationen enthalten ist.

In Abb. 4.16 sind drei Konturplots von 6k15s gezeigt, die unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen erstellt wurden. Um den Einfluss der Kalibration auszuschalten, werden die Konturplots mit Volumen-Abszisse dargestellt. Der Vergleich zeigt, dass die Form des Konturplots bei unterschiedlich großen Probenschleifen des Transferventils ähnlich bleibt. Beim Tausch der analytischen Säule gegen eine High-Speed Säule in der SEC (Säulendimension 50 x 20 mm

gegenüber 300 x 8 mm bei einer analytischen Säule) tritt eine Stauchung in der ersten Dimension und eine Dehnung in der zweiten Dimension auf. Da die High-Speed Säule eine geringere Auflösung hat als die analytische Säule, kann eine Verbreiterung der Elutionspeaks (Dehnung in der zweiten Dimension) auftreten. In Kapitel 4.1.4 wurde bereits diskutiert, dass die Erhöhung der Flussrate in der wässrigen SEC nicht ohne weiteres möglich ist. Eine Verschlechterung der Trennung kann auch durch eine abnehmende Qualität der HPLC-Säule hervorgerufen werden. Ein entsprechender Einfluss auf die in (c) beobachtete Stauchung des Konturplots ist nicht auszuschließen.

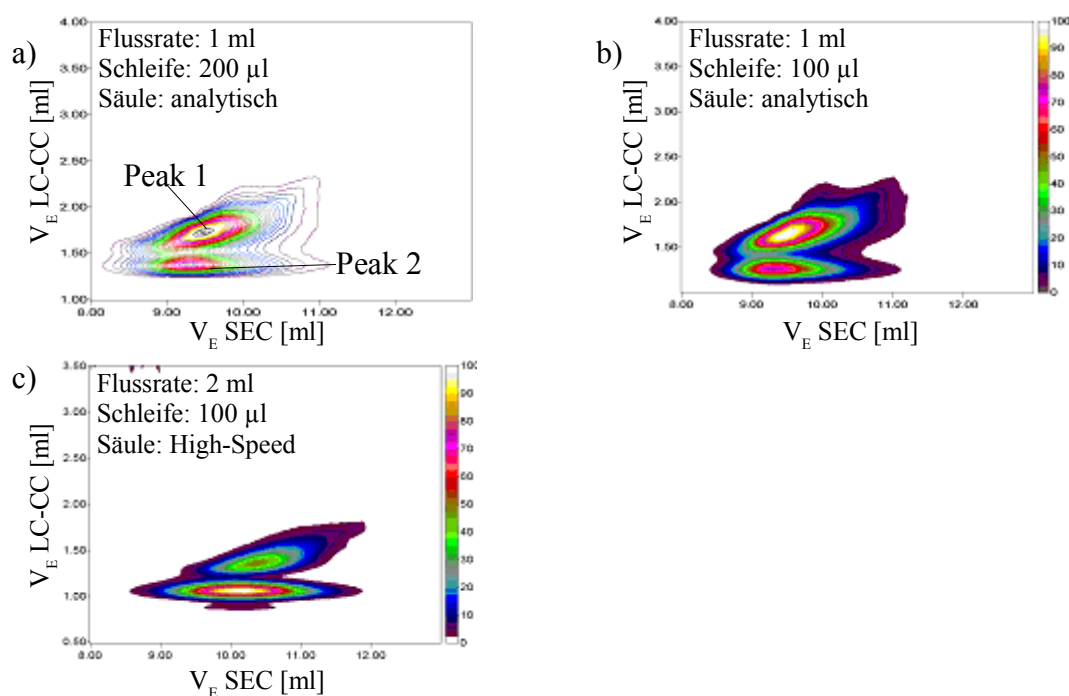


Abb. 4.45: 2D Konturplots von 6k15s bei Variation der Schleifengröße, der SEC-Säule und der Flussrate in der zweiten Dimension; LC-CC (erste Dimension): stationäre Phase: Nucleosil 100 RP 18 (250 x 4,6 mm i.d.), mobile Phase: Methanol/Wasser 81/19 (w/w); SEC (zweite Dimension): stationäre Phase: Suprema linear M, mobile Phase: 0,02 M Ammoniumacetat in Wasser

Entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 4.43 (LC-FTIR-Kopplung) ist in der 2D-Chromatographie von 6k15s (a bis c) eine deutliche Unterscheidung zwischen zwei Produkten möglich. Das mit „1“ bezeichnete PEG-g-PVOH-Copolymer ist PEG-reicher als Komponente „2“. Da in der ersten Dimension (y-Achse) bei 3 ml (Elutionsvolumen von PEG) kein Signal auftritt, kann darauf geschlossen werden, dass eine vollständige Pfropfung des PEGs stattgefunden hat. Zusätzlich zur Bestätigung der bisher erhaltenen Ergebnisse kann nun auch eine Auswertung der Molmassen für die einzelnen Produkte durchgeführt werden. Eine Zusammenfassung der für alle vier Konturplots gewonnenen Ergebnisse ist in Tab. 4.7 dargestellt.

Es zeigt sich, dass die Messungen bei 1 ml/min ähnliche Volumenanteile aufweisen, die Molmassen in b) jedoch etwa 30% niedriger sind als in a). Bei c) unterscheiden sich die Volumenanteile stark von den ersten Konturplots, die Molmassen des zweiten Peaks stimmen jedoch gut mit denen von b) überein.

Tab. 4.7: Auswertung der Konturplots von 6k15s

Flussrate, Abbildung	Vol. 1	Vol. 2	M _w 1	M _n 1	M _w 2	M _n 2
1 ml/min, 200 µl (a)	61 %	30 %	29.000	17.400	39.900	20.100
1 ml/min, 100 µl (b)	63 %	31 %	20.500	12.200	28.300	17.800
2 ml/min, 100 µl (c)	63 %	32 %	17.100	11.800	28.000	17.500

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl bei den Volumenanteilen als auch bei den Molmassen eine gute Reproduzierbarkeit gegeben ist. Schon die Betrachtung der Konturplots der gleichen Probe für unterschiedlich große Probenschleifen und verschiedene Flussraten zeigt vergleichbare Ergebnisse. Die Abweichungen der Molmassen in a) von b) und c) lassen sich auf Fehler in der hinterlegten Kalibrationskurve, nicht aber auf die Trennmethode zurückführen. Die bereits weiter oben erwähnte Stauchung des Konturplots führt zu den abweichenden Volumenanteilen in c).

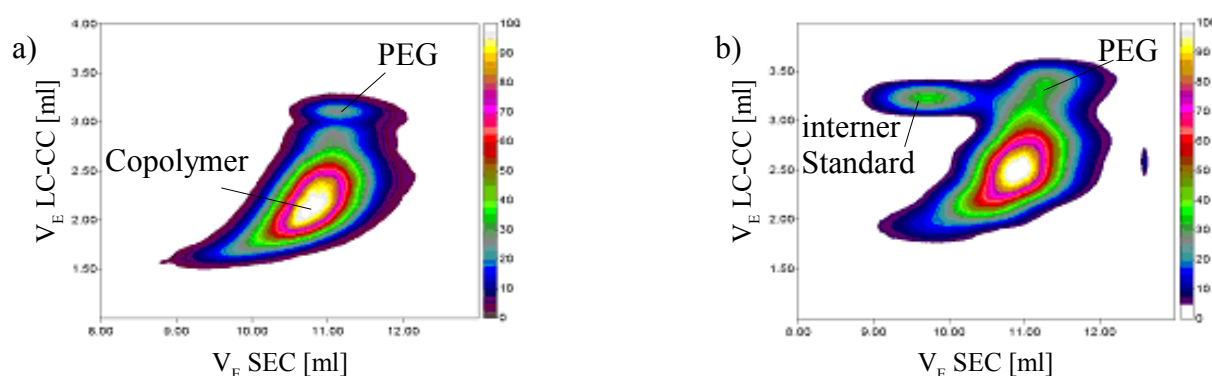


Abb. 4.46: 2D Konturplots von 6k50s ohne internen Standard (a) und mit PEG 35k als internem Standard (b), Bedingungen siehe Abb. 4.45

Um Abweichungen in der Reproduzierbarkeit der 2D erfassen zu können, wurde getestet, ob PEG 35k als interner Standard für die niedermolekularen Copolymere eingesetzt werden kann. Abb. 4.46 zeigt, dass der Zusatz von PEG 35k die Trennung des Copolymers 6k15s nicht stört. Dieser interne Standard erfüllt zwei Kontrollfunktionen. Zum einen wird die Gültigkeit der kritischen Bedingungen in der ersten Dimension überprüft. Das Elutionsvolumen muss mit dem übereinstimmen, das bei eindimensionalen Messungen mit einer Standardflussrate von 1 ml/min erzielt wird. Weiterhin müssen PEG 35k und PEG 6k gleiche Elutionsvolumina aufweisen. Zum anderen kann gleichzeitig eine Überprüfung der Kalibration für die zweite Dimension durchgeführt

werden, da die Molmasse des internen Standards bekannt ist. Die Überprüfung der Robustheit der 2D Chromatographie und zusätzliche offene Fragen müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

5 Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien und Lösemittel

Lösemittel und Salze für die Chromatographie

- Wasser (H_2O) in Reinstwasserqualität ($R = 18 \text{ M}\Omega$) durch Entsalzung (Millipore Simplicity 185)
- Methanol (MeOH) für die HPLC, Acros Organics
- Tetrahydrofuran (THF) nach Destillation und Trocknung der technischen Qualität
- *N,N*-Dimethylacetamid (DMAC) für die HPLC, Fa. Schopp, Karlsruhe
- Lithiumbromid (LiBr) für die Analyse, Acros Organics
- Essigsäure (AcOH) für die Analyse, Acros Organics
- Tris-(hydroxymethylamino)-methan (TRIS) für die Analyse, Acros Organics
- Natriumchlorid (NaCl) für die Analyse, Aldrich-Chemie
- Natriumazid (NaN_3) für die Analyse, Acros Organics
- Ammoniumacetat für die Analyse, Acros Organics

Chemikalien für die Methylierung mit Diazomethan

- *N*-Methyl-*N*-nitroso-harnstoff, Organische Chemie, TU Darmstadt
- Diethylether nach Destillation und Trocknung der technischen Qualität
- Kaliumhydroxid (KOH) p. A., Merck KG Darmstadt
- Tetrahydrofuran (THF) nach Destillation und Trocknung der technischen Qualität

Polymer Standards

Eng verteilte Polymer Standards für die GPC wurden von der Firma Polymer Standards Service GmbH (PSS) bezogen. Dies waren: Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylalkohol (PVOH), Polyvinylacetat (PVAc) und Polymethylmethacrylat (PMMA).

Für die HPLC wurden chemisch einheitliche technische Standards eingesetzt: Polymethacrylsäure (PMAS) von der Firma Röhm GmbH & Co. KG sowie teilverseifte Polyvinylalkohole (Mowiol) der Firma Kuraray Specialities Europe GmbH.

5.2 Copolymere

Modellcopolymere

Die ionischen Methacrylate wurden von der Firma Röhm GmbH & Co. KG und die PEG-Copolymere von der BASF AG zur Verfügung gestellt.

Derivatisierung mit Diazomethan

Die Methylierung der PMAS-co-PMMA-Copolymere mit Diazomethan wurde entsprechend der Vorschrift im Organikum^[97] durchgeführt:

In einen Erlenmeyer-Kolben werden unter dauerndem Schwenken des Gefäßes 0,1 mol *N*-Methyl-*N*-nitroso-harnstoff in kleinen Portionen in 100 ml Ether eingetragen, der mit 35 ml eisgekühlter 40%iger KOH unterschichtet ist. Die Temperatur darf dabei +5°C nicht überschreiten. 10 Minuten nach der letzten Zugabe gießt man die etherische Diazomethanlösung ab und trocknet sie 3 Stunden über wenig festem Kaliumhydroxid.

0,1 mol der zu alkylierenden Verbindung werden in THF gelöst und bei Zimmertemperatur in einem Kolben unter Schwenken mit so viel etherischer Diazomethanlösung versetzt, bis eine schwache Gelbfärbung bestehenbleibt bzw. bis weiterer Zusatz von Diazomethanlösung keine Stickstoffentwicklung mehr zur Folge hat. Das Lösemittel wird entfernt und der Rückstand mittels FTIR auf vollständigen Umsatz geprüft.

5.3 Chromatographische Trennungen

Die Datenaufnahme und -auswertung für alle chromatographischen Methoden erfolgte mit der Software PSS WinGPC der Firma Polymer Standards Service GmbH.

SEC für Ionische Methacrylat-Copolymere

Die Proben wurden über Nacht im Eluenten gelöst und nach Filtration durch einen Spritzenfilter injiziert.

Für die SEC wurde eine HPLC-Anlage vom Typ HP1100 der Firma Agilent Technologies mit Entgaser, Pumpe, Autosampler, Säulenofen und RI-Detektor verwendet. Aufgrund des salzhaltigen Eluenten wurde zum Schutz des Pumpenkopfs vor Korosion eine Kolbenhinterspülung installiert. Für die Lichtstreuung wurde ein Mehrwinkellichtstreuendetektor Dawn Eos mit der Software Astra (beides von der Firma Wyatt Technology, Santa Barbara) eingesetzt.

Das injizierte Volumen betrug 50 µl. Die Eluentenzusammensetzung für die anionischen Copolymere war DMAC mit 3 g/l LiBr und 100 mM (6 g/l) AcOH. Für die kationischen Copolymere wurde ein Eluent der Zusammensetzung DMAC mit 2 g/l LiBr und 2 g/l TRIS eingesetzt. Die Trennungen erfolgten bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Temperatur von 60 °C. Als stationäre Phase wurden ein Säulensatz GRAM 3000 Å, GRAM 100 Å sowie GRAM linear XL Säulen (10 m, 300 mm x 8 mm i.D.) der Firma Polymer Standards Service eingesetzt.

Um neue Säulen zu konditionieren, wurden diese für 5 Stunden bei einer Flussrate von 0,2 ml/min mit reinem DMAC und dann für 2 Stunden mit der mobilen Phase gespült. Die Temperatur wurde langsam auf 60 °C angehoben und die Säulen über Nacht bei 0,1 ml/min konditioniert. Vor der Messung wurde der Fluss auf 1 ml/min angehoben. In allen Fällen wurde eine Vorsäule (50 x 8 mm) eingesetzt.

Wässrige SEC

Für die wässrige SEC wurde eine HP 1100 HPLC Anlage der Firma Agilent Technologies mit einem Entgaser, einer Pumpe, Autosampler, Säulenofen und RI-Detektor eingesetzt. Für die Messungen mit verdampfbarem Eluenten wurde ein verdampfender Lichtstreuendetektor ELS 1000 der Firma Polymer Laboratories verwendet.

Die Messungen wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf einer analytischen Säule Suprema linear M 10 µm (300 x 8 mm) der Firma Polymer Standards Service durchgeführt.

Für die RI-Detektion wurde der Eluent Wasser + 0,08 M TRIS + 0,15 M NaCl + 0,01 M NaN₃, pH 7, für die ELS-Detektion Wasser + 0,02 M Ammoniumacetat eingesetzt.

Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption

Zur Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption wurde eine HPLC Anlage vom Typ HP 1100 der Firma Agilent Technologies mit Entgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler und Säulenofen verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Verdampfungsstreulichtdetektor der Firma Polymer Laboratories, Modell ELS 1000.

Am kritischen Punkt von PEG wurde mit einem Fluss von 1 ml/min 84 Vol.-% Methanol und 16 Vol.-% Wasser gearbeitet.

Die kritischen Bedingungen für PVAc wurden bei einer Eluentenzusammensetzung von 73 Vol.-% THF und 27 Vol.-% Wasser gefunden.

Zum Einsatz kam in beiden Fällen zunächst eine Säule Knauer Nucleosil RP18-100 250 x 4,6 mm und dann eine Säule Macherey-Nagel EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18.

2D-Chromatographie

Für die Kombination der Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption und der wässrigen SEC in der 2D-Chromatographie wurde eine HPLC-Anlage der Firma Shimadzu, Modell LC-10AD-VP, bestehend aus zwei Pumpen und einem Autosampler, verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Verdampfungslichtstreuendetektor der Firma Polymer Laboratories, Modell ELS 1000.

Die erste Dimension wurde über ein 8-Port-Ventil der Fa. Valco, Modell ET8GW, mit der zweiten Dimension (SEC) verbunden. Das 8-Port-Ventil war mit zwei Probenschleifen von je 100 µl ausgerüstet sowie mit einem elektrischen Schnellantrieb der Fa. Valco, Modell MicroDrive.

Als Trennsäulen wurden die beschriebenen Säulen eingesetzt. Um die Analysenzeit zu verkürzen, wurde die analytische SEC-Säule (300 mm x 8 mm) durch eine HighSpeed-Säule (50 mm x 20 mm) vom gleichen Typ ersetzt.

Gradientenchromatographie

Für die Gradientenchromatographie von PVAc- und PVOH-Copolymeren wurde eine HPLC-Anlage vom Typ HP 1100 der Firma Agilent Technologies aus Entgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler und Säulenofen eingesetzt. Die Detektion erfolgt mit einem Verdampfungslichtstreuendetektor ELS 1000 der Firma Polymer Laboratories.

Zur Trennung wurde der in Kapitel 4.2.4 beschriebene Gradient aus THF und Wasser auf einer Säule Knauer Nucleosil RP18-100 250 x 4,6 mm eingesetzt.

5.4 FTIR-Spektroskopie

Die offline-FTIR-Messungen wurden mit einem Spektrometer der Firma Thermo Electron GmbH, Modell Nicolet Magna, im ATR-Modus vorgenommen. Für die LC-online-Kopplung wurde das Eluat mit dem Gerät LC-Transform 100 der Firma LabConnections auf eine Germaniumscheibe aufgebracht und mit einem Optikmodul der gleichen Firma in einem FTIR-Spektrometer Nicolet Protégé 460 (Firma Thermo Electron GmbH) abgerastert. Zur Datenaufnahme und Auswertung wurde für alle Messungen die Software Omnic des Spektrometer Herstellers verwendet. Die IR-Spektren wurden in einem Messbereich von 800 cm⁻¹ bis 4000 cm⁻¹ mit 16 – 32 Scans und einer Auflösung von 4 cm⁻¹ aufgenommen.

5.5 Bestimmungen mittels MALDI-TOF-MS

Die Massenspektren wurden mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer Kompact MALDI III der Firma Kratos Analytical aufgenommen. Die Datenerfassung und -auswertung wurde mit der Software Kompact durchgeführt. Als Matrix wurde 1,8,9-Trihydroxyanthracen (Dithranol) der Firma Aldrich-Chemie verwendet.

Die Proben bzw. die getrockneten Fraktionen aus der Chromatographie werden mit einer Matrixlösung gemischt und auf einen speziellen Probenträger aufgetragen. Nach dem Trocknen wird der Probenträger in das Massenspektrometer eingebracht und mit einem Stickstofflaser schrittweise belichtet.

6 Zusammenfassung

Hydrophile Polymersysteme gewinnen aus ökonomischer und ökologischer Sicht in der Polymerforschung zunehmend an Bedeutung. Ihre Anwendung reicht von einfach aufgebauten Emulgatoren bis hin zu Spezialpolymeren in der pharmazeutischen Industrie. Die immer komplexeren Eigenschaftskombinationen erfordern neue und zunehmend präzisere Polymerisations- und Verarbeitungsverfahren. Um die Struktur-Eigenschaftsbeziehungen von hydrophilen Polymeren verstehen und beeinflussen zu können, ist eine leistungsfähige Analytik eine wichtige Voraussetzung. Während für komplexe hydrophobe Polymere eine große Bandbreite an chromatographischen Methoden, insbesondere auch gekoppelten Methoden, zur Verfügung steht, ist dies für hydrophile Polymere bisher nicht der Fall. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten anhand verschiedener Modellsysteme erstmals chromatographische Methoden für die Deformulierung von komplexen hydrophilen Copolymeren erarbeitet werden.

Anders als bei unpolaren Polymeren und Copolymeren existieren für die Bestimmung der Molmassenverteilung von hydrophilen Polymeren durch SEC keine Standardmethoden. Selbst Copolymere, die aus den gleichen Monomeren, jedoch in unterschiedlichen molaren Verhältnissen aufgebaut sind, erfordern unter Umständen verschiedene SEC-Methoden. Dies gilt insbesondere für Copolymere mit ionischen oder ionisierbaren Gruppen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nun SEC-Methoden für statistische Methacrylat-Copolymere entwickelt, die Methacrylsäure- bzw. Dimethylammoniumgruppen enthalten und sich daher wie Polyelektrolyte verhalten. Derartige Copolymere haben eine große Bedeutung als Dragierlacke in der pharmazeutischen Industrie. In der Vergangenheit wurden die mittleren Molmassen dieser Copolymere lediglich durch Lösungsviskosimetrie ermittelt. Methoden zur Bestimmung der Molmassenverteilung standen überhaupt nicht zur Verfügung.

Für Methacrylsäure enthaltende Polymethacrylate gelang es, eine robuste SEC-Methode zu entwickeln, mit der die Chromatographie ohne enthalpische Wechselwirkungen für einen großen Zusammensetzungsbereich (0 – 50 Mol.-% Methacrylsäure) möglich ist. Als stationäre Phase wird bei dieser Methode ein spezieller Polyester (GRAM linear XL) eingesetzt. Als mobile Phase wird *N,N*-Dimethylacetamid bei 60 °C verwendet, das zur Unterdrückung ionischer Wechselwirkungen mit LiBr und Essigsäure modifiziert wird. Eine Überprüfung der Ergebnisse aus dieser SEC-Methode erfolgte durch Methylierung der Copolymere und anschließende SEC-Analyse der neutralen Polymere bzw. durch die online-Kopplung der SEC mit einem molmassensensitiven

Mehrwinkellichtstreuendetektor. Die Robustheit der Methode wurde in einem Ringversuch zwischen drei verschiedenen Laboratorien (Deutsches Kunststoff-Institut, Degussa AG, Polymer Standards Service GmbH) bestätigt. Die entsprechende SEC-Methode wurde kürzlich in der Fachzeitschrift *e-Polymers* publiziert.^[98]

Weitere Untersuchungen zum chromatographischen Verhalten von hydrophilen Copolymeren haben gezeigt, dass auch die SEC von kationischen Copolymeren auf der Basis von Dimethylammoniummethacrylat auf einer Polyesterphase durchgeführt werden kann. Dabei musste jedoch die mobile Phase an die Anforderungen für kationische Polyelektrolyte angepasst werden. Eine effektive Unterdrückung von ionischen Wechselwirkungen gelang durch Zugabe eines Ionenpaar-Reagenz (TRIS) zur mobilen Phase. Ideale SEC-Bedingungen wurden mit einer mobilen Phase von DMAC + LiBr + TRIS erhalten.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurden chromatographische Methoden für hydrophile segmentierte Copolymere entwickelt. Für die Untersuchung des chromatographischen Verhaltens derartiger Copolymere wurden PEG-haltige Kammcopolymere als Modellsysteme ausgewählt. Diese Kammcopolymere wurden durch Pfropfung von Methacrylsäure auf PEG bzw. durch Copolymerisation von Methacrylsäure und PEG-Makromonomeren hergestellt. Die Modellpolymere wiesen nicht nur Verteilungen nach der Größe und den Anteilen der einzelnen Segmente auf. Bedingt durch die Herstellungsverfahren entstanden häufig Gemische aus den erwünschten Copolymeren und den Homopolymeren. Da solche komplexen Copolymere in Bezug auf mehrere Eigenschaften uneinheitlich aufgebaut sind, müssen hier mehrdimensionale Analysemethoden angewendet werden, um deren Struktur hinreichend genau abbilden zu können. Mehrdimensionale Analysemethoden für hydrophile Polymersysteme standen zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung. Es war daher ein Ziel der Untersuchungen, derartige Methoden für verschiedene Polymersysteme zu erarbeiten.

Ein wesentliches Problem bei der Flüssigchromatographie von hydrophilen Polymeren besteht in den eingeschränkten Detektionsmöglichkeiten. Diese ergeben sich daraus, dass die mobilen Phasen oft mit Salzen modifiziert werden müssen, um unerwünschte Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase zu unterdrücken. Diese Salze beeinträchtigen in vielen Fällen die Detektierbarkeit im ELSD (verdampfender Lichtstreuendetektor), der ansonsten häufig als Alternative zum Brechungsindex-Detektor für nicht UV-aktive Polymere eingesetzt wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, die normalerweise nichtflüchtigen Salze durch das flüchtige Salz

Ammoniumacetat zu ersetzen. Auf diese Weise wurde es möglich, den ELSD als universellen Detektor nicht nur in der SEC, sondern auch in der zweidimensionalen HPLC einzusetzen.

PMAS-g-PEG-Copolymere wurden durch die Copolymerisation eines PEG-Makromonomeren mit Methacrylsäure (MAS) erhalten. Zur Bestimmung der chemischen Uneinheitlichkeit wurden die Produkte durch Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption (LC-CC) in die eigentlichen Kammcopolymere und das Nebenprodukt MPEG aufgetrennt. Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde nachgewiesen, dass MPEG als Nebenprodukt bei der Herstellung des Makromonomeren anfällt. In einem zweiten Schritt wurde die LC-CC mit der FTIR-Spektroskopie gekoppelt. Durch Messung der Intensitätsverläufe charakteristischer Absorptionen für die MAS- und PEG-Einheiten konnte festgestellt werden, dass die Copolymere neben Fraktionen mit hohem MAS-Anteil auch Fraktionen mit niedrigem MAS-Anteil enthalten. Die Auftrennung der Kammcopolymere nach der chemischen Zusammensetzung und der Molmasse gelang durch zweidimensionale Chromatographie. Dabei wird die LC-CC mit der wässrigen SEC gekoppelt. Durch die Verwendung eines verdampfenden Salzes in der mobilen Phase der SEC konnte der ELSD als Detektor eingesetzt werden. Die 2D-Chromatographie bestätigte die Vermutung, dass die Copolymerfraktionen mit hohem MAS-Anteil auch höhere Molmassen aufweisen. Für Fraktionen mit geringerem MAS-Anteil wurden niedrigere Molmassen gefunden.

Durch Pfropfung von MAS auf PEG wurde eine Serie von PEG-g-PMAS-Copolymeren erhalten. Mit der LC-CC wurde nachgewiesen, dass die Pfropfung nicht vollständig verläuft. Gleichzeitig gelang die chromatographische Trennung des Eduktes vom Pfropfcopolymeren und die Quantifizierung des nicht gepfropften PEG. Um mehr Informationen über das heterogen aufgebaute Pfropfprodukt zu erhalten, wurde die LC-CC mit der FTIR gekoppelt. Die Ergebnisse der LC-CC/FTIR-Messungen zeigten, dass bei der Pfropfung Copolymerfraktionen mit sehr unterschiedlichem MAS-Gehalt entstanden sind. Eine Isolierung und Quantifizierung der einzelnen Produkte war mit eindimensionalen chromatographischen Methoden jedoch nicht möglich. Die Auftrennung aller Produktbestandteile wurde mit der 2D-Chromatographie erreicht. Durch die Kopplung der LC-CC mit der wässrigen SEC gelang nicht nur die Auftrennung der verschiedenen Pfropfprodukte, sondern auch die Bestimmung ihrer Molmassenverteilung. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass mit steigendem MAS-Anteil im Eduktgemisch bei der Pfropfung mehr und zunehmend höhermolekulare Copolymere mit hohem MAS-Anteil gebildet werden.

Neben ionischen hydrophilen Copolymeren beschäftigte sich die vorliegende Arbeit auch mit nicht ionischen hydrophilen Copolymeren des Typs PEG-g-PVOH. Diese wurden durch Verseifung von PEG-g-PVAc-Copolymeren erhalten, die ihrerseits durch Pfropfung von Vinylacetat (VAc) auf PEG hergestellt wurden. Die chemische Uneinheitlichkeit der Copolymere wurde mit der LC-CC am kritischen Punkt von PEG (für die PEG-g-PVOH-Copolymere) bzw. am kritischen Punkt von PVAc (für die PEG-g-PVAc-Copolymere) untersucht. Die LC-CC (PEG) zeigte, dass das chromatographische Verhalten der Copolymere stark von der chemischen Zusammensetzung abhängt. Bei hohem PEG-Anteil in der Reaktionsmischung enthalten die Reaktionsprodukte ungepfropftes PEG, dessen Menge mit zunehmender Molmasse des Rückgrats und zunehmendem VOH-Anteil (bzw. VAc-Anteil) abnimmt. Mit der LC-CC (PVAc) wurde nachgewiesen, dass die Reaktionsprodukte keine signifikanten Mengen an PVAc enthalten. Um die chemische Heterogenität bezüglich des Hydrolysegrades chromatographisch abbilden zu können, wurde eine Gradientenmethode angewendet, mit der sowohl PEG-g-PVAc als auch PEG-g-PVOH untersucht wurden. Dies ermöglichte den Nachweis geringer Mengen PVOH im PEG-g-PVOH, was durch die LC-CC (PEG) aufgrund der Coelution mit dem Pfropfprodukt nicht möglich war. Die Ergebnisse der Einzelmethode wurden durch mehrdimensionale Methoden für die PEG-g-PVOH-Copolymere bestätigt und ergänzt. Die LC-FTIR-Kopplung erlaubte selbst bei chromatographisch scheinbar einheitlichen Proben den Nachweis verschiedener Komponenten, indem der PEG-Gehalt in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen bestimmt wurde. Die Kopplung der LC-CC (PEG) mit der wässrigen SEC in der 2D-Chromatographie ermöglichte die Trennung verschiedener Produkte voneinander. Neben der Quantifizierung der einzelnen Komponenten wurden die zugehörigen Molmassenverteilungen bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass auch für hydrophile Copolymere chromatographische Kopplungsmethoden genutzt werden können. Es wird deutlich, dass eine reine Übertragung der Methoden von nicht wässrigen auf wässrige Systeme nicht möglich ist. Vielmehr ist eine sorgfältige Abstimmung der Techniken und Detektionsmethoden aufeinander nötig. Die vorliegenden Ergebnisse können als wichtige Grundlage für weitere Forschungen auf diesem Gebiet genutzt werden.

7 Verwendete Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	Bedeutung
$[\eta]$	intrinsische Viskosität
2D-Chromatographie	zweidimensionale Flüssigchromatographie
A	Absorption
A_2	2. Virialkoeffizient
AcOH	Essigsäure
c	Konzentration
D	Polydispersität (M_w/M_n)
d	Schichtdicke
ΔG	Gibbs Energie
ΔH	Enthalpieänderung
DiMPEG	zweifach methoxyterminiertes PEG
DIN	Deutsche Industrie Norm
DMAC	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
dn/dc	Brechungsindex-Inkrement
ΔS	Entropieänderung
EO	Ethylenoxid
FAE	Fettalkoholethoxylat
FTIR	Fourier Transformations Infrarot Spektroskopie
Gew. %	Gewichtsprozent
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie (GPC=SEC)
GRAM	SEC-Säulenmaterial auf Polyesterbasis
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IR	Infrarot
K	Verteilungskoeffizient
k	Absorptionskoeffizient
λ	Wellenlänge
LAC	Adsorptionschromatographie
LC	Flüssigchromatographie
LC-CC	Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption
LiBr	Lithiumbromid
MA	Methylacrylat
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight
MALLS	Mehrwinkellichtstreuung (Multi Angle Laser Light Scattering)

Abkürzung	Bedeutung
MAS	Methacrylsäure
mM	Millimolar (= mmol/l)
MMA	Methylmethacrylat
M_n	zahlenmittlere Molmasse
MPEG	methoxyterminiertes PEG
MPEG-MM	Makromonomer aus MPEG mit Methacrylsäureendgruppe
M_w	gewichtsmittlere Molmasse
N_A	Avogadro-Konstante
NaCl	Natriumchlorid
NaN_3	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NMR	magnetische Kernresonanz
NP	Normalphase
P(MMA-co-EA)	Poly(methylmethacrylat-ethylacrylat)-Copolymer
P(MMA-co-MA)	Poly(methylmethacrylat-methylacrylat)-Copolymer
PEG	Polyethylenglykol
PMAS	Polymethacrylsäure
PMMA	Methylmethacrylat
PO	Propylenoxid
PVAc	Polyvinylacetat
PVOH	Polyvinylalkohol
r	Radius
$R(\theta)$	Excess-Rayleigh-Verhältnis
RP	Umkehrphase
SDV	Styroldivinylbenzol
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography) (GPC=SEC)
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris-(hydroxymethylamino)-methan
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VAc	Vinylacetat
V_E	Elutionsvolumen
Vol. %	Volumenprozent

8 Literaturverzeichnis

- [1] H.G. Elias, *Makromoleküle, Bd. 1*, Hüthig & Wepf Verlag, Basel Heidelberg New York, 1990
 - [2] W.W. Yau, J.J. Kirkland, D.D. Bly, *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1979
 - [3] G. Glöckner, *Polymer Characterization by Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1987
 - [4] H. Pasch, B. Trathnigg, *HPLC of Polymers*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1998
 - [5] H. Dautzenberg, W. Jaeger, J. Kötz, B. Philipp, Ch. Seidel, D. Stscherbina, *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*, Carl Hanser Verlag, Munich Vienna New York, 1994
 - [6] J.V. Dawkins, *Compreh. Polym. Sci.* **1** (1989) 231
 - [7] P.L. Dubin, *Aqueous Size Exclusion Chromatography*, Elsevier Amsterdam, 1988
 - [8] A. Wade, P.J. Weller (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd ed., Pharmaceutical Press, London, 1994
 - [9] B. Wittgren, A. Welinder, B. Porsch, *J. Chromatogr. A* **1002** (2003) 101-109
 - [10] T.C. Schunk, *J. Chromatogr. A* **661** (1994) 215-226
 - [11] H. Benoit, Z. Grubisic, P. Rempp, D. Decker, J.-G. Zilliox, *J. Chim. Phys* **63** (1966) 1507
 - [12] Z. Grubisic, P. Rempp, H. Benoit, *J. Polymer Sci. Polymer Letters* **5** (1967) 753
 - [13] T. Kato, T. Hashimoto, T. Fujimoto, M. Nagasawa, *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* **13** (1975) 1849-1854
 - [14] D. Kranz, H.U. Pohl, H. Baumann, *Angew. Makromol. Chem.* **26** (1972) 67-84
 - [15] A. Dondos, P. Rempp, H. Benoit, *Makromol. Chem.* **175** (1974) 1659-1663
 - [16] G. Glöckner, *Gradient HPLC of Copolymers and Chromatographic Cross-Fractionation*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1991
 - [17] G. Glöckner, *Adv. Polym. Sci.* **79** (1986) 159
 - [18] B.G. Belenkii, E.S. Gankina, M.B. Tennikov, L.Z. Vilenchik, *Dokl. Akad. Nauk SSR* **231** (5) (1976) 1147-1149
 - [19] B.G. Belenkii, M.D. Valchikhina, I.A. Vakhtina, E.S. Gankina, O.G. Tarakanov, *J. Chromatogr.* **129** (1976) 115-124
-

-
- [20] B.G. Belenkii, E.S. Gankina, M.B. Tennikov, L.Z. Vilenchik, *J. Chromatogr.* **147** (1978) 99-110
- [21] A.M. Skvortsov, B.G. Belenkii, E.S. Gankina, M.B. Tennikov, *Vysokomol. Soed. A* **20** (3) (1978) 678-686
- [22] M.B. Tennikov, P.P. Nefedov, M.A. Lazareva, S.Y. Frenkel, *Vysokomol. Soed. A* **19** (3) (1977) 657-660
- [23] A.M. Skvortsov, A.A. Gorbunov, *J. Chromatogr.* **358** (1986) 77
- [24] A.A. Gorbunov, A.M. Skvortsov, *Adv. Colloid Interface Sci.* **62** (1995) 31
- [25] H. Pasch, *Polymer* **34** (19) (1993) 4095-4099
- [26] H. Pasch, C. Brinkmann, Y. Gallot, *Polymer* **34** (19) (1993) 4100-4104
- [27] H. Pasch, M. Augenstein, *Makromol. Chem.* **194** (9) (1993) 2533-2541
- [28] H. Pasch, Y. Gallot, B. Trathnigg, *Polymer* **34**(23) (1993) 4986-4989
- [29] A. Gorbunov, B. Trathnigg, *J. Chromatogr. A* **955** (2002) 9-17
- [30] H. Pasch, I. Zammert, *J. Liquid Chromatogr.* **17** (14-15) (1994) 3091-3108
- [31] T. Macko, D. Hunkeler, *Adv. Polym. Sci.* **163** (2003) 61-136
- [32] S. Mori, *Anal. Chem.* **34** (23) (1989) 530-534
- [33] P.P. Nefedov, *Polymer Sci. USSR* **23** (1981) 1055
- [34] R.J. Brüssau, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **61** (1992) 199-218
- [35] S. Förster, M. Schmidt, *Adv. Polym. Sci.* **120** (1995) 51-133
- [36] K.A. Stacey, *Light-Scattering in Physical Chemistry*, Butterworths, London, 1956
- [37] P.J. Flory, *Principles in Polymer Science*, 15. Auflage, Cornell University, Cornell, 1990
- [38] M. Antonietti, A. Briel, S. Förster, *J. Chem. Phys* **105** (17) (1996) 7795-7807
- [39] M. Antonietti, A. Briel, S. Förster, *Macromolecules* **30** (1997) 2700-2704
- [40] K. Rissler, *J. Chromatogr. A* **742** (1996) 1-54
- [41] B. Trathnigg, B. Maier, A. Gorbunov, A. Skvortsov, *J. Chromatogr. A* **791** (1997) 21-35
- [42] A. Skvortsov, B. Trathnigg, *J. Chromatogr. A* **1015** (2003) 31-42
- [43] D. Cho, S. Park, J. Hong, T. Chang, *J. Chromatogr. A* **986** (2003) 191-198
-

-
- [44] D. Cho, J. Hong, S. Park, T. Chang, *J. Chromatogr. A* **986** (2003) 199-206
- [45] M. Zanette, A. Marcomini, E. Marchiori, R. Samperi, *J. Chromatogr. A* **756** (1996) 159-174
- [46] C. Rappel, B. Trathnigg, A. Gorbunov, *J. Chrom. A* **984** (2003) 29-43
- [47] K.H. Spiestersbach, K. Rode, H. Pasch, *Macromol. Symp.* **193** (2003) 129-141
- [48] A.V. Gorshkov, H. Much, H. Becker, H. Pasch, V.V. Evreinov, S.G. Entelis, *J. Chromatogr.* **523** (1990) 91-102
- [49] H. Pasch, W. Hiller, *Macromolecules* **29** (1996) 6556-6559
- [50] P. Jandera, M. Holcapek, L. Kolárová, *J. Chromatogr. A* **869** (2000) 65-84
- [51] B. Trathnigg, B. Maier, D. Thamer, *J. Liquid Chrom.* **17** (19) (1994) 4285-4302
- [52] H. Pasch, C. Brinkmann, H. Much, U. Just, *J. Chromatogr. A* **623** (2) (1992) 315-322
- [53] H. Pasch, H. Much, G. Schulz, *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* **52** (1993) 79-90
- [54] H. Pasch, *Macromolecular Symposia* **110** (1996) 107-120
- [55] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, *Anal. Chem.* **70** (1998) 4353-4360
- [56] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, *Anal. Chem.* **70** (1998) 1585-1594
- [57] B. Trathnigg, M. Kollroser, C. Rappel, *J. Chromatogr. A* **922** (2002) 193-205
- [58] B. Trathnigg, C. Rappel, *J. Chromatogr. A* **952** (2002) 149-163
- [59] E. Meehan, S. O'Donohue, A.G. Williams, J.V. Dawkins, *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* **51** (1992) 151
- [60] E. Meehan, S.P. Reid, E. Samios, J.V. Dawkins, *Macromol. Symp.* **110** (1996) 65-80
- [61] J.V. Dawkins, T.A. Nicholson, A.J. Handley, E. Meehan, A. Nevin, P.L. Shaw, *Polymer* **40** (2003) 7331-7339
- [62] A.M. Striegel, *J. Chrom. A* **971** (2002) 151-158
- [63] B.M. Budhlall, K. Landfester, D. Nagy, E.D. Sudol, V.L. Dimonie, D. Sagl, A. Klein, M.S. El-Aasser, *Macromol. Symp.* **155** (2000) 63-84
- [64] H. Egret, V.L. Dimonie, E.D. Sudol, A. Klein, M.S. El-Aasser, *J. Appl. Polym. Sci.* **82** (2001) 1739-1747
- [65] G. Callec, A.W. Anderson, G.T. Tsao, J.E. Rollings, *J. Polym. Sci.* **22** (1984) 287-293
- [66] G. Muller, C. Yonnet, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **5** (1984) 197-201
-

-
- [67] T. Kato, T. Tokuya, T. Nozaki, A. Takahashi, *Polymer* **25** (1984) 218-224
- [68] H.G. Barth, F.E. Regnier, *J. Chromatogr.* **192** (1980) 275-293
- [69] H.G. Barth, In: T. Provder (Ed.), *ACS Symposium Series No. 352* (1987) chapter 2
- [70] S. Mori, H.G. Barth, *Size Exclusion Chromatography*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1999
- [71] P.S.G. Krishnan, S. Veeramani, R.H. Vora, T.S. Chung, S.I. Uchimura, H. Sugitani, *J. Chromatogr. A* **977** (2002) 207-212
- [72] N. Gaillard, A. Guyot, J. Claverie, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **41** (2003) 648-698
- [73] M. Vamvakaki, N.C. Billingham, S.P. Armes, *Polymer* **40** (1999) 5160-5171
- [74] S.L. Phillips, L. Ding, M. Stegemiller, S.V. Olesik, *Anal. Chem.* **75** (2003) 5539-5543
- [75] S.L. Phillips, S.V. Olesik, *Anal. Chem.* **75** (2003) 5544-5553
- [76] P.J. Wyatt, *Anal. Chim. Acta* **272** (1993) 1-40
- [77] R. Brüssau, N. Goetz, W. Mächtle, J. Stölting, *Tenside Surf. Det.* **28 (6)** (1991) 396-406
- [78] M. Augenstein, M. Stickler, *Makromol. Chem.* **191 (2)** (1990) 415-428
- [79] T.C. Schunk, T.E. Long, *J. Chromatogr. A* **692** (1995) 221-232
- [80] S.T. Balke, R.D. Patel, *J. Polym. Sci. Polym. Lett* **18** (1980) 453-456
- [81] P. Kilz, *Labor Praxis* **6** (1992) 628
- [82] P. Kilz, R.P. Krüger, H. Much, G. Schulz, *Polym. Mater. Sci. Eng.* **69** (1993) 114
- [83] P. Kilz, R.P. Krüger, H. Much, G. Schulz, *Advan. Chem. Ser.* **247** (1995) 223-241
- [84] P. Kilz, H. Pasch, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (R.A. Meyers, ed.) Wiley, Chichester, 2000
- [85] J. Adrian, D. Braun, H. Pasch, *LC-GC Int.* **11** (1998) 32
- [86] A. Siewing, J. Schierholz, D. Braun, G.P. Hellmann, H. Pasch, *Macromol. Chem. Phys.* **202** (2001) 2890
- [87] A. Siewing, B. Lahn, D. Braun, H. Pasch, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **41** (2003) 3143
- [88] J.J. Gagel, K. Biermann, *Anal. Chem.* **58** (1986) 2184
- [89] J.N. Willis, L. Wheeler, *Polym. Mater. Sci. Eng.* **69** (1993) 120
-

-
- [90] L.M. Wheeler, J.N. Willis, *Appl. Spectrosc.* **47** (1993) 1128
- [91] J.N. Willis, J.L. Dwyer, M.X. Liu, *Proc. International GPC Symposium '94*, Lake Buena Vista, FL, 1993
- [92] Deutsches Institut für Normung e.V., *DIN 55672-2; GPC, Teil 2: DMAC als Elutionsmittel*, Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, 1998
- [93] E.S. Rufino, E.E.C Monteiro, *Polymer* **44** (2003) 7189-7198
- [94] S. Kutsumizu, N. Nagao, K. Tadano, H. Tachino, E. Hirasawa, S. Yano, *Macromolecules* **25** (25) (1992) 6829-6835
- [95] H.C. Chiu, T. Hsiue, W.Y. Chen, *Polymer* **45** (2004) 1627-1636
- [96] C.M. Guttman, E.A. Di Marzio, J.F. Douglas, *Macromolecules* **29**(17) (1996) 5723-5733
- [97] K. Schwetlick, *Organikum*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001
- [98] M. Adler, H. Pasch, C. Meier, R. Senger, H.K. Koban, M. Augenstein, G. Reinhold, *e-Polymers* **055** (2004)
-

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.